



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA Y LABORATORIO

2016

QUÍMICA BIOLÓGICA

LICENCIATURA EN QUÍMICA

Profesores: Dra. Fanny Zirulnik
Dra. Ethel V. Larregle

Responsable de Trabajos Prácticos: Lic. Nuria Mitjans

ALUMNOS REGULARES

1. Para el cursado de la asignatura el alumno deberá haber aprobado los cursos de Química Orgánica I y Biología General; regularizado los siguientes cursos: Química Orgánica II y Química Física II.
2. Los alumnos conocerán, al comenzar el cuatrimestre, las fechas y los temas de los trabajos prácticos de aula, como así también las fechas de las Evaluaciones Parciales. Todo lo mencionado será informado en el avisador de la asignatura. Además, en la presente guía se encuentra adjunto el cronograma de actividades.
3. La fundamentación teórica de los trabajos prácticos se desarrollará en las clases teóricas así como en la guía de trabajos prácticos.
4. La bibliografía de cada uno de los temas a desarrollar estará a disposición de los alumnos en el Área de Química Biológica y se les dará a conocer la que se encuentra para consulta en Biblioteca.
5. Los conocimientos del alumno sobre la fundamentación teórica de los Trabajos Prácticos, serán evaluados antes, durante, o al final del desarrollo de los mismos.
6. Cada alumno llevará un cuaderno o carpeta en el que consignará los resultados y observaciones, a la manera de informe de los Trabajos Prácticos realizados. Al final de cada jornada el Jefe de Trabajos Prácticos podrá revisar y constatar los resultados obtenidos.
7. Para la aprobación de los Trabajos Prácticos el alumno deberá obtener resultados adecuados, responder satisfactoriamente las preguntas y cuestionarios de trabajos prácticos, y para ser considerado alumno regular en el curso deberá aprobar las Evaluaciones Parciales programadas y haber asistido al menos al 60% de las clases teóricas.
8. De acuerdo a la reglamentación vigente (Ord. N° 13/03 y su modificatoria Ord. N° 32/14) los alumnos deberán aprobar el cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos y de las Evaluaciones Parciales sobre los mismos.
9. Los horarios de comienzo de los Trabajos Prácticos están pautados con suficiente anticipación para que el alumno los conozca, por lo tanto deberá llegar en horario y no existirá tolerancia respecto a las tardanzas. En el caso que un alumno ingrese al Trabajo Práctico después del comienzo del mismo, implicará un ausente en el cuestionario y deberá recuperar dicho práctico.
10. Por las mismas reglamentaciones, los alumnos tendrán dos (2) oportunidades de recuperación de los Trabajos Prácticos de aula, debiendo aprobar en primera instancia el 75% (o su fracción menor) completando la aprobación del noventa por ciento (90%) en la primera recuperación. En la segunda recuperación deberá totalizar la aprobación del cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos.
11. Para poder rendir cada evaluación parcial, los alumnos deberán tener aprobado el ciento por ciento (100%) de los trabajos prácticos cuyos contenidos se evalúan en la misma. Estas evaluaciones podrán ser escritas u orales y se aprobarán con el **65%** del puntaje total.
12. Teniendo en cuenta la Ord. N° 32/14, para ser considerado como alumno regular se deberá aprobar el 100% de las Evaluaciones Parciales. Cada Parcial tendrá dos (2) recuperaciones. La primera recuperación se llevará a cabo en no menos de 48 horas de publicado el resultado del Parcial. La

segunda recuperación se realizará al final del cuatrimestre. Ambas recuperaciones se aprobarán con el **75%** del puntaje total.

ALUMNOS CON PROMOCION SIN EXAMEN FINAL

Este Curso de Química Biológica considera la posibilidad de aprobación por Promoción sin examen final. Para acceder a dicha Promoción los alumnos deberán:

- 1-** En el momento de inscribirse al curso, cumplir con las exigencias de correlatividades establecidas en el plan de estudio para rendir el examen final de esta asignatura. Las materias que deberán estar aprobadas son : Química Orgánica II y Química Física II.
- 2-** Para mantener la condición de alumno promocional deberá cumplir, como mínimo, con la asistencia al ochenta por ciento (**80%**) de las actividades teóricas programadas.
- 3-** Aprobar los trabajos prácticos de laboratorio y aula con igual exigencia que los alumnos regulares
- 4.** Evaluaciones y recuperaciones: Se realizarán evaluaciones parciales de la totalidad del programa teórico y de Trabajos Prácticosl
- 5.** Cada evaluación será escrita u oral, según la naturaleza del tema. Para aprobar cada evaluación parcial se requiere el 70% del puntaje total. Las evaluaciones se calificarán con una nota, en la escala del 1 (uno) al 10 (diez). Para aprobar se requerirá un mínimo de 7 (siete) puntos
- 6-** Aprobar una evaluación adicional, de modalidad oral, sobre el tema de Integración Metabólica.
- 7-** Los alumnos que opten por la Promoción sin examen final tendrán solo dos (2) recuperaciones para todas las evaluaciones Parciales. Estas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.
- 8-** Pérdida de la promoción: en el caso de no satisfacerse algunas de las condiciones establecidas en este reglamento, el alumno será considerado regular si cumple con las respectivas condiciones de regularidad.

NORMAS DE BIOSEGURIDAD QUE EL ALUMNO DEBERA CUMPLIR PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO

Riesgo Biológico

La manipulación o exposición a los agentes biológicos puede traer como consecuencia la infección del personal expuesto, con o sin manifestación de la enfermedad. En el hombre, el riesgo de infección es el más significativo (por la frecuencia e importancia) y el más antiguo de los reconocidos por los profesionales de la salud. Entre las causas atribuidas a las infecciones del personal de laboratorio se destacan: el uso de objetos punzo-cortantes contaminados con fluidos corporales, los derrames o salpicaduras, el trabajo con animales de laboratorio, no tomar las adecuadas medidas de protección, etc.

Reglas críticas de higiene y seguridad

Al formarse como profesional, debe tener en cuenta una serie de normas, que contribuirán a llegar a resultados exactos, a un correcto desempeño en las actividades a desarrollar en un laboratorio, y al cuidado de la salud.

Las normas de seguridad están hechas para la protección de su vida, por lo tanto su cumplimiento es **OBLIGATORIO**. A saber:

- 1) Los pasillos de circulación, vías de evacuación y puertas de emergencia no deben estar obstruidas.
- 2) El **uso del guardapolvo y guantes de látex es obligatorio** dentro del laboratorio. El uso de barbijo y lentes es obligatorio en el trabajo práctico que lo requiera.
- 3) No se permitirá la entrada a los laboratorios con pantalones cortos, chinelas o cabello largo suelto.
- 4) Está terminantemente prohibido fumar, comer, e ingerir bebidas en el laboratorio.
- 5) Deberá mantener su mesada y pileta limpias. Para ello a cada trabajo práctico debe traer una rejilla o repasador limpio.
- 6) Al comenzar el trabajo práctico, todo el material debe estar limpio y seco para evitar inexactitudes.
- 7) No malgaste los reactivos. No los impurifique con pipetas sucias, esto perjudicará su trabajo y el de sus compañeros. Nunca devuelva al recipiente original una sustancia que se ha sacado del mismo, pues podría contaminarla.
- 8) Cuando trabaje con material biológico (sangre total, suero, orina) utilice guantes, debe considerarlo material infecto contagioso.
- 9) Los tips y pipetas, luego de ser utilizados, deberán ser descartados dentro de los correspondientes recipientes con lavandina, para una descontaminación previa al lavado final. No los deje apoyados sobre la mesada.
- 10) No deberá pipetear ácidos, álcalis, o cualquier producto corrosivo o tóxico, con la boca, use una pera o pro-pipeta. Si algún reactivo es accidentalmente ingerido, avise de inmediato al personal docente.
- 11) Si algún líquido corrosivo toca su cuerpo, use la **ducha** y lave la zona afectada con abundante agua, si los afectados son los ojos use el **lavaojos** y lávelos durante 15 minutos luego solicite primeros auxilios.
- 12) Todas las operaciones que desprendan gases tóxicos y/o irritantes deberán efectuarse **bajo la campana extractora sin excepción**.

- 13) En caso de derrame de ácidos ó solventes se procederá a volcar sobre el mismo un balde de arena destinado a tal fin, ubicado en nuestro laboratorio, en la mesa lateral.
- 14) Dilución de ácidos: Cuando realice la dilución de un ácido proceda a añadir lentamente el ácido al agua contenida en un vaso, agitando constantemente y enfriando el vaso receptor. **Nunca añadir agua al ácido** (*no se debe bañar el ácido*).
- 15) Uso y Tratamiento de reactivos y soluciones químicas:
- a- Al usar cualquier tipo de reactivos, asegúrese que es el correcto y **lea bien su etiqueta**. Si es transferido a otro recipiente, **rotúlelo de nuevo**.
 - b- Todos los reactivos deberán manejarse con el material perfectamente limpio. Todos los sólidos deberán manejarse con espátula.
 - c- No utilizar reactivos sin haber registrado sus propiedades en el cuaderno de laboratorio, enterándose de los riesgos de su uso y tomando las precauciones pertinentes.
 - d- **No manipular productos inflamables (benceno, tolueno, éter, etc.) en presencia de mecheros encendidos.**
 - e- Cuando un reactivo requiera una agitación vigorosa por inversión del recipiente, tápelo con un tapón de vidrio esmerilado o de goma, **nunca lo haga con la mano**.
 - f- Al calentar una solución y/o reactivo, hágalo en recipientes adecuados para ese efecto.
 - g- Al calentar una solución en un tubo de ensayo debe hacerse bajo el nivel del líquido y agitando constantemente. **No dirigir la boca del tubo** hacia compañero o a sí mismo, pues puede proyectarse.
 - h- Cualquier material caliente debe colocarse sobre una placa resistente al calor.
 - i- Algunos desperdicios líquidos podrán desecharse en las piletas de descarga con un rango pH moderado de 6-8, dejando correr suficiente agua, ya que muchos de ellos pueden ser corrosivos. Soluciones alejadas de estos pH deberán primero **ser neutralizadas antes de desecharlas**.
- 16) Todos los desperdicios sólidos y papeles, no patológicos o contaminantes, deberán colocarse en los botes de basura. Los residuos sólidos patológicos o contaminantes **deberán desecharse en los recipientes con bolsas rojas** destinados a tal fin. El material de vidrio roto deberá descartarse en recipientes especiales para ese efecto.
- 17) Con respecto al Trabajo Práctico: Luego de finalizado el trabajo práctico, lave el material, enjuáguelo con agua destilada y déjelo secar.
- 18) Controle que todo el instrumental que utilizó (espectrofotómetro, centrífugas, peachímetro, etc.) quede limpio, apagado y cubierto con su funda si fuera necesario.
- 19) Las bromas en su trabajo pueden causar accidentes, no las haga, trabaje con seriedad pensando que está próximo a desempeñarse como profesional. En el laboratorio **no corra, camine**.

LICENCIATURA EN QUÍMICA – 2016 – Primer Cuatrimestre**CRONOGRAMA DE TEORIAS Y TRABAJOS PRÁCTICOS**

HORARIO TEORÍAS:	MARTES	17:00 – 19:00 hs. (A Magna)
	JUEVES	16:00-18:00 hs. (A Magna)
HORARIOS DE T.P. DE AULA:	VIERNES	10:00- 13:00 (AULA 38)
HORARIOS DE TP DE LABORATORIO:	LUNES	10:00- 13:00

<u>MARZO</u>	TEMAS
JUEVES 17	ENZIMAS (BOL 1)
MARTES 22	ENZIMAS (CONT BOL 1)
JUEVES 24	FERIADO
LUNES 28	<u>TP LAB N° 1: Estudio de la Actividad Enzimática de la Invertasa de Levadura. Influencia del pH y la Temperatura.</u>
MARTES 29 (BOLILLA 2)	ENZIMAS DE OXIDOREDUCCION. CADENA RESPIRATORIA
JUEVES 31	CADENA RESPIRATORIA. FOTOSÍNTESIS (CONT BOLILLA 2)
<u>ABRIL</u>	
VIERNES 1	TP AULA N° 1: Enzimas
LUNES 4	<u>TP LAB N° 2: Transporte Electrónico Mitocondrial</u>
MARTES 5	METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN (BOLILLA 3).
JUEVES 7	METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO. VIA GLICOLÍTICA. (BOLILLA 3)
VIERNES 8	TP AULA N° 2: Transporte Electrónico. Fosforilación Oxidativa.
LUNES 11	<u>TP LAB N° 3: Transporte Electrónico Fotoinducido.</u>
MARTES 12	METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO. CICLO DE. KREBS Y VIA DE LAS PENTOSAS (BOLILLA 4)
JUEVES 14	METAB. DEL GLUCÓGENO. (BOLILLA 5) CONSULTA PRIMER PARCIAL.
VIERNES 15	<i>PRIMER PARCIAL</i> (ENZIMAS. CADENA RESPIRATORIA)
LUNES 18	<u>TP LAB N° 4: Efecto Pasteur</u>
MARTES 19	METAB. DEL GLUCÓGENO. GLUCONEOGÉNESIS (BOLILLA 5)
JUEVES 21	DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS.

VIERNES 22	TP AULA N° 3: Hidratos De Carbono (PARTE I)
LUNES 25	TP AULA N° 4: Hidratos De Carbono (PARTE II)
MARTES 26	LIPOPROTEÍNAS (BOLILLA 6).
JUEVES 28	DEGRADACIÓN DE ACIDOS GRASOS (CONT BOLILLA 6)
VIERNES 29	<i>RECUPERATORIO PRIMER PARCIAL</i>
<u>MAYO</u>	
LUNES 2	<u>TP LAB N° 5: Determinación de Ácido Cítrico</u>
JUEVES 5	DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS (CONT BOLILLA 6).
VIERNES 6	<i>SEGUNDO PARCIAL</i> (METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO)
JUEVES 12	BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS (BOLILLA 7).
VIERNES 13	<i>RECUPERATORIO SEGUNDO PARCIAL</i>
MARTES 17	BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS (BOLILLA 7)
JUEVES 19	DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE PROTEÍNAS (BOLILLA 8).
VIERNES 20	TP AULA N° 5: Metabolismo de Lípidos.
MARTES 24	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS (BOLILLA 8)
JUEVES 26	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS (CONT BOLILLA 8) CONSULTA TERCER PARCIAL.
VIERNES 27	<i>TERCER PARCIAL</i> (METABOLISMO DE LÍPIDOS)
MARTES 31	METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS (BOLILLA 9).
<u>JUNIO</u>	
JUEVES 2	METABOLISMO DEL HEM (BOLILLA 9). Para Bioqca y Fcia METABOLISMO DE DNA Y RNA. Para Lic.en Química.
VIERNES 3	<i>RECUPERATORIO TERCER PARCIAL</i>
MARTES 7	RECEPTORES (BOLILLA 10) Para Bioqca y Fcia BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS - Para Lic.en Química
JUEVES 9	HORMONAS (CONT BOLILLA 10). Para Bioqca y Fcia MEMBRANA. Para Lic.en Química.
VIERNES 10	TP AULA N° 6: Metabolismo de Aminoácidos y Nucleótidos.
MARTES 14	INTERRELACIONES METABÓLICAS (BOLILLA 11).

VIERNES 17 **CUARTO PARCIAL** (METAB. DE AMINOÁCIDOS, NUCLEÓTIDOS Y HEM)

MARTES 21 **EXPOSICIÓN PROBLEMAS DE INTERRELACIONES**
METABÓLICAS

JUEVES 23 **RECUPERATORIO CUARTO PARCIAL**

LUNES 27 **RECUPERATORIO DE PARCIALES**

MARTES 28 **RECUPERATORIO DE PARCIALES**

MIÉRCOLES 29 **RECUPERATORIO DE PARCIALES**

JUEVES 30 **RECUPERATORIO DE PARCIALES**

TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA

TRABAJO PRÁCTICO N° 1: ENZIMAS**OBJETIVOS**

Que el alumno sea capaz de:

- Describir las propiedades generales de las enzimas.
- Comprender la cinética enzimática y mecanismos de regulación.
- Determinar gráficamente los valores de K_m .
- Interpretar la acción de distintos tipos de inhibidores.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas catalizan prácticamente todas las reacciones biológicamente importantes. Se encuentran entre las más notables biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico. Una reacción catalizada por una enzima se puede esquematizar:



La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado o de sustrato consumido, en un tiempo dado (producto formado/min, o de sustrato consumido/min), en una mezcla que contenga todos los factores requeridos para la reacción. Esta determinación guarda relación con la cantidad de enzima presente y no es significativamente influida por los cambios producidos en la mezcla si se mide la *velocidad inicial*, es decir cuando la cantidad de sustrato utilizado es aún insignificante en relación con el total presente en la mezcla.

Para medir la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones:

Unidades Internacionales: una UI es una medida de la cantidad de una sustancia, basada en su actividad biológica mediada (o sus efectos). Es usada para vitaminas, hormonas, algunas drogas, vacunas, productos sanguíneos y sustancias biológicamente activas similares. La definición precisa de 1 UI difiere de una sustancia a otra y es establecida por acuerdo internacional.

Una **Unidad de enzima** es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol ($1\mu\text{mol} = 10^{-6} \text{ mol}$) de sustrato por minuto bajo condiciones definidas de pH y temperatura.

$$\text{Unidad de Enzima} = \frac{\mu\text{mol de Sustrato Transformado}}{\text{min.}}$$

La **actividad específica** indica la pureza relativa de una preparación enzimática y relaciona la actividad enzimática no con el volumen de la muestra, sino con el total de proteínas existentes en la misma.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\mu\text{mol de S transformado/min. (Unidad de enzima)}}{\text{mg de proteínas}}$$

En un proceso de purificación el aumento de la actividad específica indicará que se han ido eliminando proteínas que no tienen la acción catalítica perseguida. La actividad específica llega a ser máxima y constante cuando la enzima se encuentra al estado puro.

Cuando se tiene la enzima al estado puro y se conoce su peso molecular, se puede calcular su **actividad molar ó número de recambio** que corresponde al número de moléculas (ó moles) de sustrato convertidos en producto por unidad de tiempo (minuto) por una molécula (ó mol) de enzima trabajando en condiciones de saturación de sustrato.

$$\text{Número de Recambio} = \frac{\text{moles de sustrato transformado/ min.}}{\text{mol de enzima}}$$

Diversos factores modifican la actividad enzimática, los cuales deben ser tenidos en cuenta para determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Ellos son: **concentración de enzima, concentración de sustrato, temperatura, pH, concentración de cofactores y presencia de inhibidores.**

Regulación de la actividad enzimática

La actividad de las enzimas en las células puede ser regulada por varios mecanismos. En casi todas las vías metabólicas existen una ó más enzimas que actúan como reguladoras que pueden aumentar o disminuir su actividad de acuerdo a señales específicas.

La actividad de las enzimas en las células puede ser ajustada a los requerimientos fisiológicos, cambiantes de momento a momento. Existen varios mecanismos de regulación de las reacciones enzimáticas:

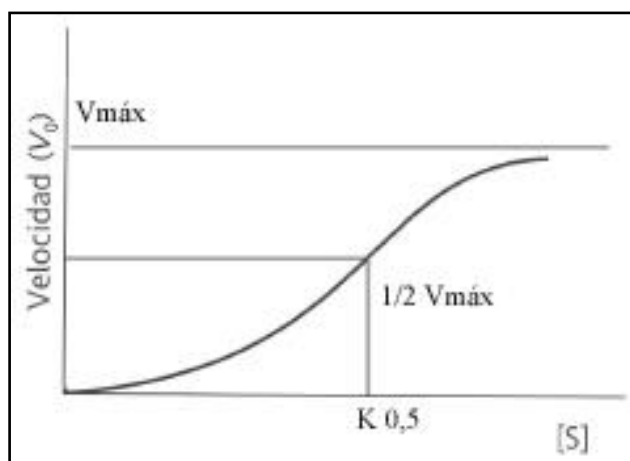
- a) Los que modifican la actividad de las enzimas:
 - Enzimas alostéricas
 - Enzimas reguladas por modificación covalente
 - Enzimas reguladas por modificación proteolítica: Zimógenos
 - Enzimas reguladas por compartimentalización celular: Isoenzimas
- b) Los que regulan la cantidad de enzima presente:
 - Inducción o Represión de la síntesis de enzimas.
 - Degradación proteolítica de la proteína enzimática.

- Enzimas alostéricas.

En algunas vías metabólicas, la enzima que cataliza la primera etapa de la serie suele ser inhibida por el producto de la última. Cuando la concentración de ese producto final aumenta, ello indica que su síntesis excede las necesidades de la célula, se frena el funcionamiento de la vía reduciendo la actividad de la enzima reguladora. En este caso se habla de **regulación por retroinhibición**. Por ejemplo, la aspartato transcarbamilasa, que cataliza la primera reacción, en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina, es inhibida por citidina trifosfato (CTP), que es el producto final de esa vía metabólica (ver página 92).

En las enzimas alostéricas, además del sitio catalítico, existen otros sitios reguladores a los cuales se unen específicamente las moléculas que ejercen acción activadora o inhibidora sobre su actividad, estos agentes se llaman moduladores, modificadores o efectores alostéricos (positivos o negativos).

Estas enzimas están constituidas por varias subunidades polipeptídicas entre las cuales existe algún tipo de comunicación, que hace que cuando un modulador positivo se une a ellas produzca un cambio de conformación, la cual se transmite a las otras subunidades de tal forma que favorece al sitio activo para recibir al sustrato, si el modulador es negativo impide la unión del sustrato al sitio activo.



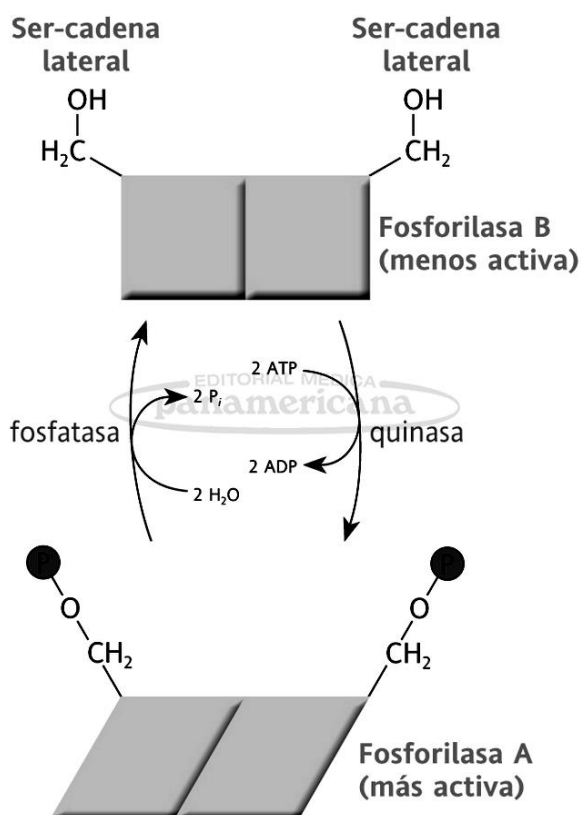
Curva sigmoidea de actividad en función de concentración de sustrato de una enzima alostérica Modificado desde Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez, "Bioquímica. Conceptos esenciales".

La cinética de estas enzimas no sigue la de las enzimas *michaelianas*, sus curvas son sigmoideas. Cuando un modulador se une a una subunidad, se produce un cambio de conformación que se transmite a las otras y modifica la aptitud del sitio activo para recibir al sustrato.

- Modificación covalente

Hay enzimas reguladas por agregado o sustracción de grupos unidos covalentemente. Por ejemplo, la glucógeno fosforilasa, enzima presente en músculo e hígado que inicia la vía de degradación del glucógeno. Esta enzima se encuentra en un estado de baja actividad llamado *fosforilasa b*, la cual es convertida en *fosforilasa a*, activa, por adición de restos de fosfato que se unen al hidroxilo de

residuos de serina de la molécula de enzima. Es decir que la actividad de estas enzimas es modulada por la inserción covalente de fosfatos, principalmente, como se muestra en el esquema a continuación:



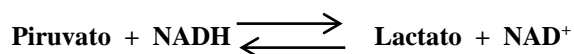
Extraída de Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez, "Bioquímica. Conceptos esenciales".

- Isoenzimas.

Son diferentes formas moleculares de una misma enzima. Las isoenzimas tienen igual **especificidad** de sustrato y **diferente** afinidad, es decir presentan distintos valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$. Por ejemplo: La hexoquinasa y la glucoquinasa (isoenzima IV de la primera) actúan sobre glucosa con un K_m de 0,1 mM y 10 mM, respectivamente. La reacción que catalizan es la siguiente:



Debido a que poseen diferente estructura aminoacídica y por lo tanto, distinto PM y/o carga, las isoenzimas se pueden separar por electroforesis en gel. Una de las mejores estudiada es la lactato deshidrogenasa, que presenta cinco isoenzimas cada una de las cuales presentan una composición aminoacídica diferente. El sustrato de la misma es el piruvato o el lactato. La reacción que catalizan es la siguiente:



La distribución relativa de la actividad enzimática entre las cinco formas es característica para cada tejido dependiendo de la función del mismo.

- Control por proteínas: activación proteolítica. Zimógenos

Ciertas enzimas son producidas en las células de origen al estado de precursores inactivos llamados *zimógenos*, *proenzimas* o *preeenzimas*. La mayoría de estos precursores son proteínas simples que se convierten en enzima activa por un proceso de hidrólisis. Ejemplos de *zimógenos* son algunos componentes de los jugos digestivos, los cuales se activan al llegar a la luz intestinal. Por ej: pepsinógeno que en presencia de la acidez del estómago se convierte en pepsina, la enzima activa. Otro ejemplo es el tripsinógeno, secretado por el páncreas, el cual se hidroliza por la enteroquinasa a tripsina, la enzima activa.

Inhibidores enzimáticos

Existen agentes químicos que inhiben reversible o irreversiblemente la acción catalítica de las enzimas.

La inhibición reversible puede ser: Competitiva y No Competitiva.

Los **inhibidores competitivos** aumentan el valor de K_m pero no modifican la $V_{máx}$ de la enzima. El inhibidor presenta similitud estructural con el sustrato y ambos compiten por el sitio activo de la enzima.

Los **inhibidores no competitivos** son compuestos que se unen a la enzima en un lugar diferente al sitio activo y provocan una disminución de la $V_{máx}$ sin modificar K_m .

Estas inhibiciones se pueden representar gráficamente sobre la curva de V_i en función (S) y su inversa, la ecuación de Lineweaver-Burk.

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1- En el siguiente cuadro se muestra el progreso de una purificación enzimática, típica para una enzima hepática. Con los datos de purificación dados, calcular:

- Unidades totales
- Actividad específica
- Porcentaje de recuperación global

Interprete los resultados obtenidos:

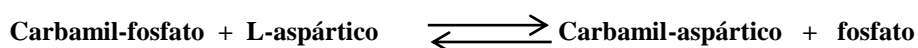
Fracción de la enzima	Vol. (ml)	U/ml	Unidades totales	Prot. (mg/ml)	Act. Esp.	% Rec
Homogenato crudo de hígado	200	100		2.50		
Precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 45%	80	200		1.25		
DEAE-Celulosa ó agarosa	20	500		1.00		
Electroforesis	5	1500		1.00		
Cristalización	3	2000		0.30		

2- La enzima anhidrasa carbónica de los glóbulos rojos ($\text{PM}=30.000$) se halla entre la más activas de las enzimas conocidas. Cataliza la hidratación reversible del anhídrido carbónico, importante en el transporte del CO_2 desde los tejidos a los pulmones:



Si $10 \mu\text{g}$ de la enzima pura catalizan la hidratación de $0,30 \text{ g.}$ de CO_2 en 1 minuto a 37°C en las condiciones óptimas, calcúlese el nº de recambio (K_{cat}) de la anhidrasa carbónica en unidades de min^{-1} .

3- La enzima aspartato transcarbamilasa cataliza la primera reacción propia de la biosíntesis de pirimidina:



En un estudio cinético sobre esta enzima aislada de *E.coli* utilizando aspártico como sustrato, en presencia de CTP $0,5 \text{ M}$ y en ausencia del mismo, se obtuvieron los siguientes datos:

Aspártico (Molar)	v (unidades arbitrarias)	
	Ausencia de CTP	CTP 0,5 M
1×10^{-3}	0,45	0,20
2×10^{-3}	0,80	0,40
3×10^{-3}	1,70	0,70
4×10^{-3}	2,90	1,00
5×10^{-3}	3,40	1,40
7×10^{-3}	4,30	2,40
9×10^{-3}	5,10	3,70
10×10^{-3}	5,30	4,20
12×10^{-3}	5,60	4,80
15×10^{-3}	5,80	5,50
16×10^{-3}	5,80	5,60
17×10^{-3}	5,80	5,60

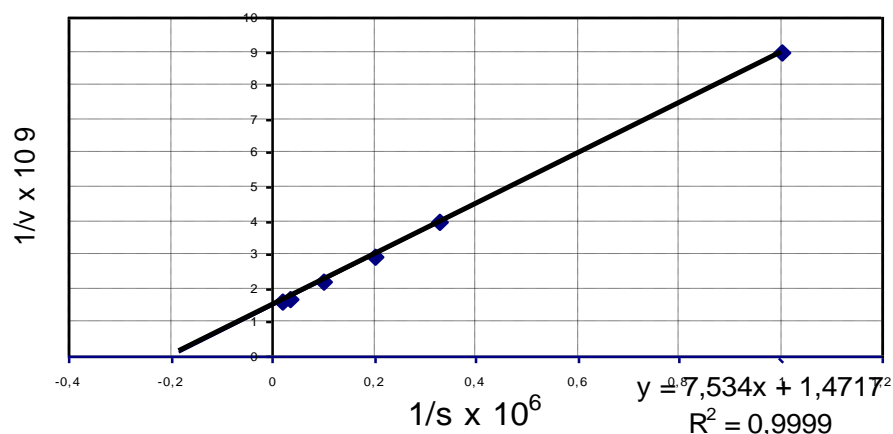
- Sin utilizar ninguna representación gráfica estímesese el valor de K_m .
- Calcule este parámetro utilizando la ecuación de Michaelis Menten. ¿Existe alguna discrepancia entre estas dos determinaciones. Justificar.
- ¿Qué efecto ejerce el CTP sobre el sistema enzimático? Justifíquelo graficando.

4- La penicilina es hidrolizada y con ello inactivada por la penicilinasasa (también conocida como β -lactamasa), una enzima presente en algunas bacterias resistentes a este antibiótico. El PM de este enzima en *Staphylococcus aureus* es 29.507. La cantidad de penicilina hidrolizada en un minuto en una disolución de 10 ml que contiene 10^{-9} g de penicilinasasa purificada se midió como función de la concentración de penicilina. Supóngase que la concentración de penicilina no cambia durante el ensayo.

[Penicilina] (μM)	1/[S] (M^{-1})	Cant. Hidrolizada (nM)	1/v (min/M)
1	10^6	0.11	9×10^9
3	$0,33 \times 10^6$	0.25	4×10^9
5	$0,20 \times 10^6$	0.34	$2,94 \times 10^9$
10	$0,10 \times 10^6$	0.45	$2,22 \times 10^9$
30	$0,033 \times 10^6$	0.58	$1,71 \times 10^9$
50	$0,02 \times 10^6$	0.61	$1,64 \times 10^9$

Con la representación de 1/V frente a 1/[S] realizada a partir de los datos de la tabla responda:

Gráfica de Lineweaver Burk de la Enzima Penicilinas



a) ¿Parece obedecer la penicilinas a la cinética de Michaelis-Menten? Si es así, ¿cuál es el valor de $V_{m\acute{a}x}$?

b) ¿Cuál es el valor de K_m ?

5- Una enzima que cataliza la reacción $S \rightarrow P$ se ensaya con diferentes concentraciones de sustrato, concentración de enzima y condiciones de trabajo constantes. Se mide la velocidad inicial para cada una de las concentraciones ensayadas obteniéndose los resultados que se indican en la tabla.

[S] (Molar)	V_i (μ moles/l.min)
1×10^{-2}	75
1×10^{-3}	74,9
1×10^{-4}	60,0
$7,5 \times 10^{-5}$	56,25
$6,26 \times 10^{-6}$	15,0

- Determinar K_m de la enzima y $V_{m\acute{a}x}$ para la concentración de enzima utilizada.
- ¿Cuál sería la velocidad inicial con $[S]$ $2,5 \times 10^{-5}$ y $5,0 \times 10^{-5}$ M?
- Calcular V_i para una $[S]$ 0,02 M.
- Si se duplica la concentración de enzima para una $[S]$ de 10^{-4} M ¿Cuál sería V_i ?
- Para una $[S] = 0,04$ M, calcule la concentración de productos al cabo de 3 minutos.

6- La glucógeno fosforilasa es una enzima que regula su actividad por modificación covalente de su molécula. Esta enzima actúa sobre el glucógeno liberando unidades de glucosa 1-fosfato. Cuando la glucógeno fosforilasa está fosforilada es activa (fosforilasa a) y cuando se defosforila es inactiva (fosforilasa b). Considerando este concepto, indique qué le ocurriría a la enzima en presencia de:

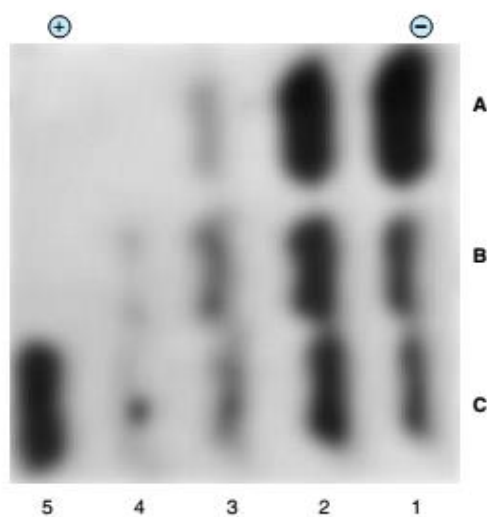
- a) Fosforilasa quinasa y ATP
- b) Fosforilasa fosfatasa
- c) Que otra enzima del metabolismo del glucógeno se vería afectada y de que manera, cuando actúan a o b.

7- Un paciente presenta un nivel plasmático de LDH total (enzima lactato deshidrogenasa) de 400 UI/l. El valor de referencia estimativo de **LDH total** en suero es de 100-200 UI/l. La elevación de la actividad de LDH justificó hacer un análisis del patrón de isoenzimas.

Subunidades de las Isoenzimas de LDH:

- I₁: H₄
- I₂: MH₃
- I₃: M₂H₂
- I₄: M₃H
- I₅: M₄

De acuerdo al resultado que observa en el patrón de electroforesis deduzca el origen de la lesión tisular en A y en C, comparándolo con el patrón normal.



A y C: Patrones Patológicos de LDH en suero humano

B: Patrón Normal de LDH en suero humano

Extraído de Bioquímica Ilustrada de Harper. Edición 26. 2003

GUIA DE ESTUDIO**Enzimas:**

Clasificación. Cofactores enzimáticos.

Unidad de Enzima, Actividad Específica e Índice de Cambio.

Ecuación de Michaelis-Menten: Determinación gráfica de K_m y $V_{máx}$:

- ¿En qué condiciones se alcanza $V_{máx}$. en una reacción enzimática?
- ¿Qué importancia tiene la determinación del K_m de una enzima?

Ecuación de Lineweaver-Burk. Determinación de K_m y $V_{máx}$.

Definición de K_m . Su importancia. ¿Qué factores modifican su valor?

Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática.

Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas.

Inhibición competitiva y no competitiva.

Representación gráfica de Lineweaver-Burk: diferencia entre un inhibidor competitivo y no competitivo:

- Complejos que se forman en presencia de un inhibidor competitivo y no competitivo.
- ¿Qué modificaciones presenta la pendiente y las intersecciones en cada tipo de inhibición?
- ¿Qué parámetros se modifican cuando actúan los dos tipos de inhibidores?

Isoenzimas:

Propiedades, composición, K_m , separación electroforética.

Regulación metabólica.**1- Enzimas alostéricas:**

- ¿Qué entiende por retroinhibición?
- ¿Qué propiedades tiene una enzima alostérica?
- ¿Cuál es el comportamiento de la enzima alostérica frente a concentraciones crecientes de sustrato?
- ¿Dónde se une el modulador o efector y cómo se modifica la actividad enzimática?

2- Modulación covalente

- ¿Cómo se realiza el proceso de regulación covalente?
- Ejemplifique con la enzima fosforilasa.

Zimógenos:

- ¿Son enzimas activas?
- ¿La activación de los zimógenos es irreversible? Explique por qué.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2**TRANSPORTE ELECTRÓNICO. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA****Objetivos**

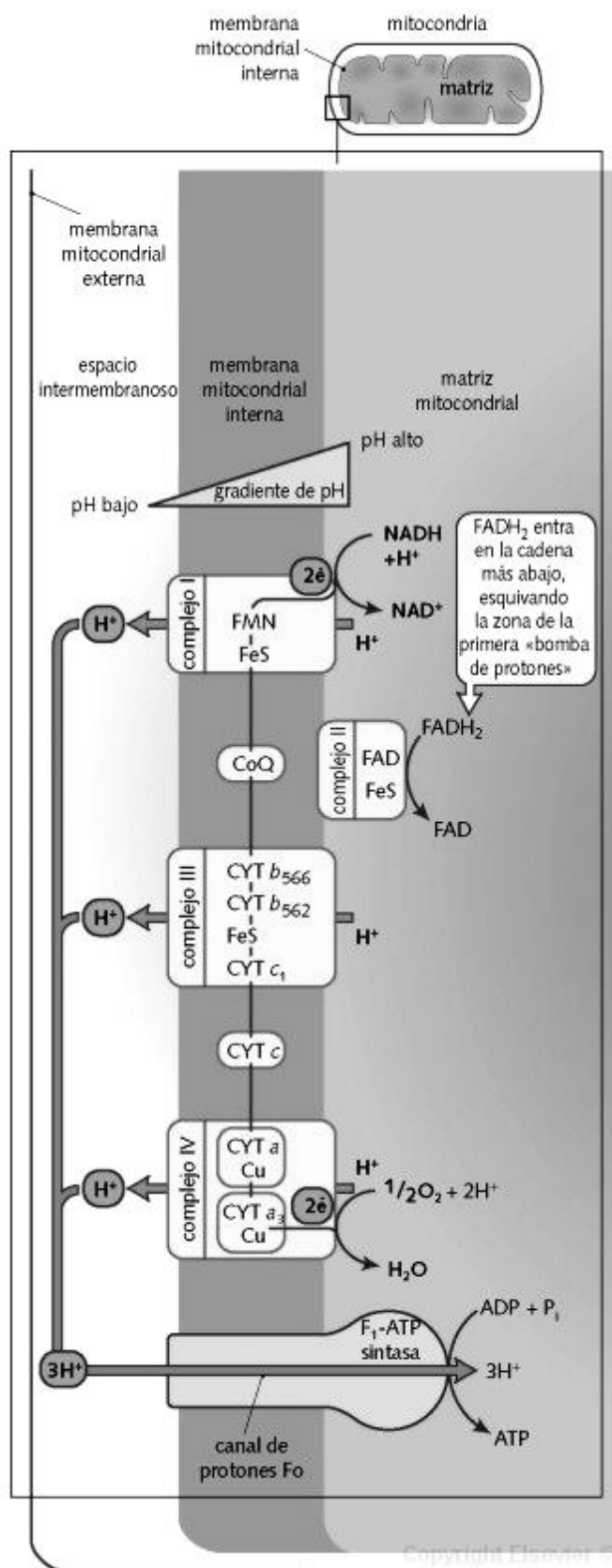
Que el alumno sea capaz de:

- Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- Interpretar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.

CADENA RESPIRATORIA

Una de las funciones principales de las mitocondrias es la de transformar la energía de óxido-reducción que se obtiene al degradar los nutrientes, en energía química de enlaces anhidrido de ácido del ATP. La mayor parte de la síntesis de ATP se realiza en condiciones aeróbicas, durante la oxidación completa de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Los restos carbonados de estos compuestos ingresan al Ciclo de Krebs, principalmente como Acetil-CoA y también como otros intermediarios del ciclo, los cuales al ser oxidados hasta CO_2 y H_2O , producen a través de deshidrogenasas, equivalentes de reducción (Hidrógenos y electrones) que son transportados a través de la cadena respiratoria de la membrana interna mitocondrial hasta el oxígeno, para formar agua.

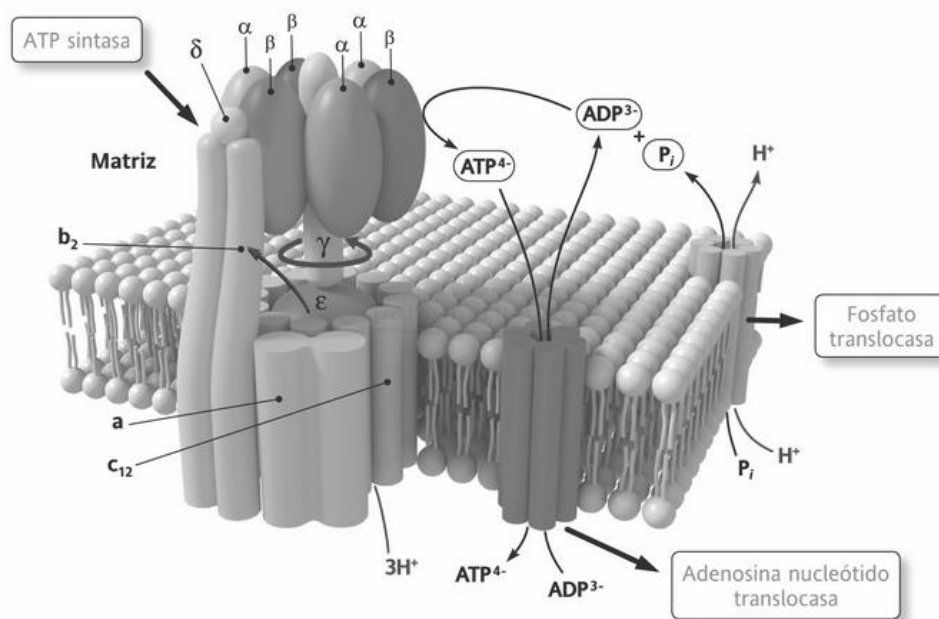
La energía redox del transporte electrónico se utiliza para expulsar H^+ al exterior de la matriz mitocondrial, formándose un gradiente de concentración de H^+ , que al ingresar a través del ATP sintasa $\text{F}_1 - \text{F}_0$, proporcionan la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). El proceso se denomina fosforilación oxidativa.



Extraído de "Metabolismo y nutrición". Benyon, S. Harcourt Brace, 1998.

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La energía producida por la transferencia de electrones es aplicada a la síntesis de ATP. La **teoría quimiosmótica** sostiene que el proceso de transporte electrónico actúa como un sistema translocador de protones desde la matriz hacia el espacio exterior a la membrana interna, originando un gradiente de protones y creando una diferencia de potencial eléctrico entre ambas caras. La síntesis de ATP ocurre en las partículas submitocondriales que actúan como ATP sintasa. Como la membrana interna es impermeable a los mismos, sólo lo puede hacer a través de estructuras que permitan eludir la apolaridad de la capa. Estos sitios corresponden a la fracción proteica F_0 del complejo F_1F_0 (ATP sintasa). Dos protones ingresan a la proteína F_0 , que provee un canal iónico a través de la bicapa lipídica y al llegar a F_1 , se activa la ATP sintasa y se genera ATP. En la siguiente figura se muestra el pasaje de protones a través de la membrana y la síntesis de ATP.



Estructura y funcionamiento de la ATP sintasa. Feduchi, Blasco, Romero, Yañez. Bioquímica

Inhibidores de la transferencia de electrones

Algunos compuestos actúan inhibiendo la transferencia de electrones y de este modo impiden la síntesis de ATP.

Compuesto	Comentario	Modo de Acción
Rotenona Amital Clorpromazina	Insecticida Barbitúrico: induce el sueño Sedante	Impiden la transferencia electrónica desde Fe-S a la Coenzima-Q
Antimicina A	Antibiótico	Bloquea la transferencia electrónica desde cit b a cit c ₁
Cianuro Monóxido de carbono Azida sódica	Veneno Gas tóxico Sustancia tóxica	Inhiben la citocromo oxidasa. Cianuro y azida reaccionan con la forma férrica del hemo y el CO con la ferrosa.

Inhibidores de la Fosforilación Oxidativa

Otros inhibidores bloquean directamente la fosforilación, pero al estar el sistema fuertemente acoplado, la oxidación también se bloquea.

Compuesto	Comentario	Modo de acción
Oligomicina	Antibiótico	Bloquea el flujo de protones a través de F ₀ .

La **Oligomicina** es un antibiótico derivado de los actinomicetes, que actúa como **inhibidor de la fosforilación**. El bombeo de protones continúa hasta que se produce una saturación del mismo y esto provoca el cese del transporte. La fuerza protón motora se genera pero no es neutralizada por la formación de ATP, se produce, por lo tanto, una presión negativa que **impide el transporte de electrones**.

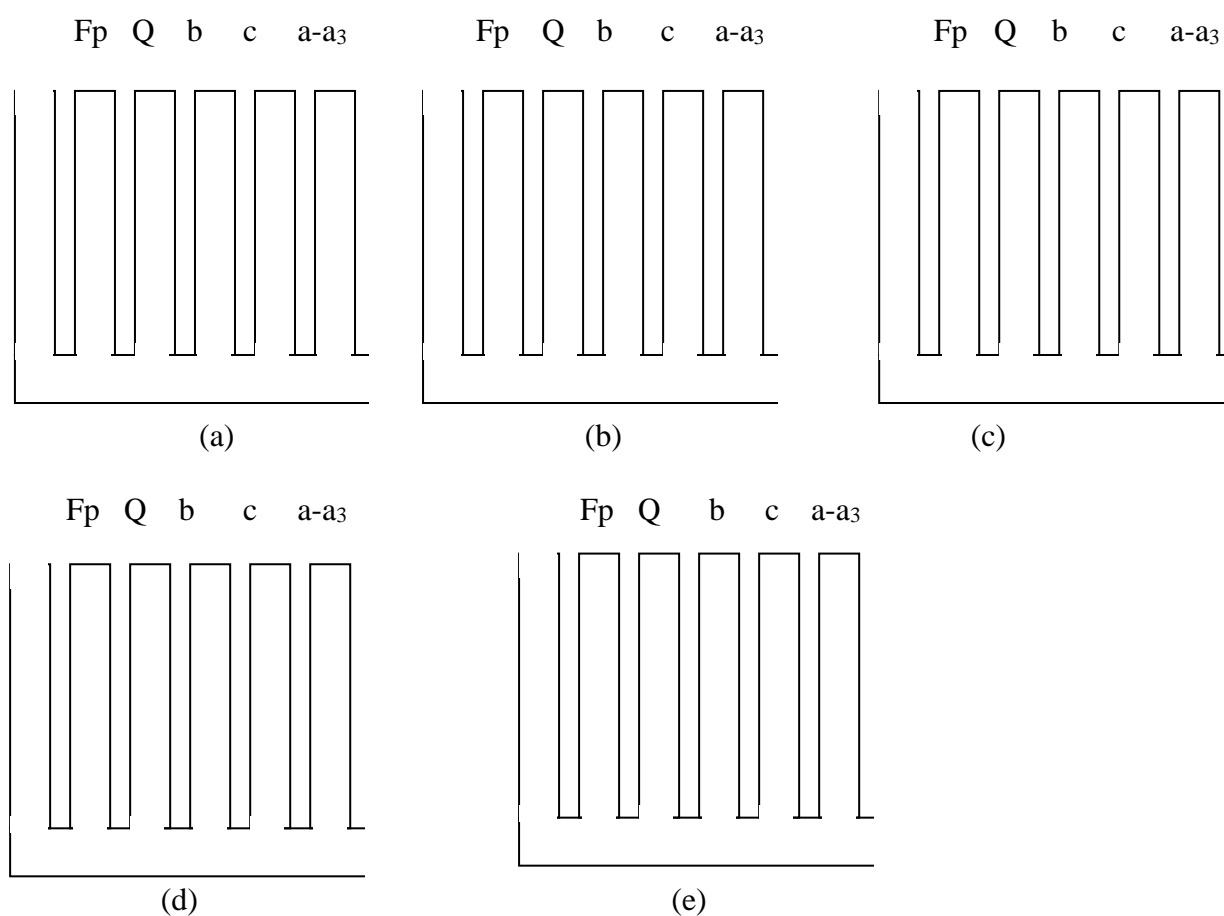
Desacoplantes

Son compuestos que desconectan el acoplamiento que existe entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, impidiendo la síntesis de ATP, sin inhibir el flujo de electrones hacia el O₂. Ejemplo: 2,4-dinitrofenol y dicumarol. Estos agentes son sustancias **liposolubles** que descargan el gradiente de protones formado por el transporte electrónico, haciendo regresar protones a través de la membrana interna, comportándose como ionóforos de protones. De esta forma, promueven la salida de protones a través de la membrana, disipando la fuerza motriz protónica e inhibiendo la síntesis de ATP.

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1- El grado de reducción de cada transportador electrónico en la cadena respiratoria está determinado por las condiciones existentes en la mitocondria. Dibújese la analogía hidráulica apropiada con la cadena respiratoria, para cada una de las condiciones indicadas:

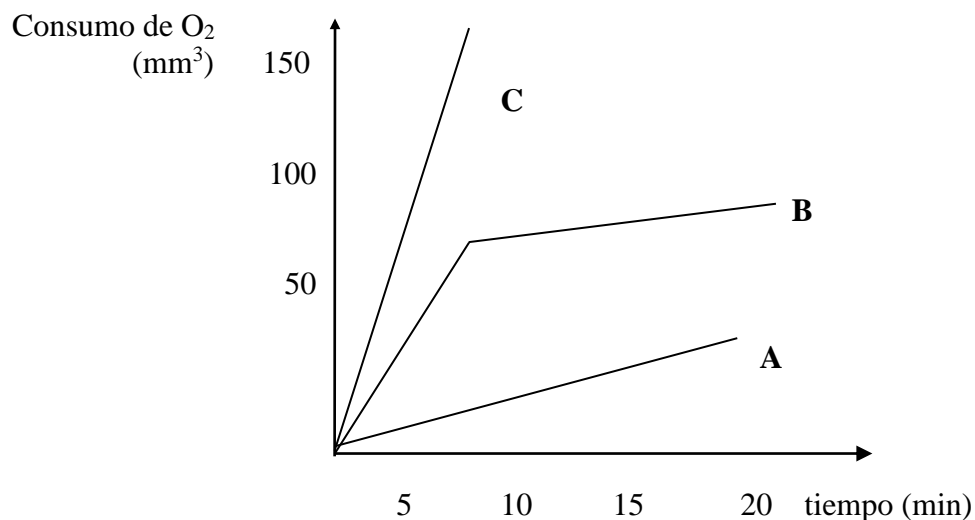
- (a) Aporte abundante de NADH y de O_2 .
- (b) Aporte abundante de O_2 pero no hay NADH
- (c) Aporte abundante de NADH y O_2 , pero se le añade antimicina
- (d) Aporte abundante de NADH pero no hay oxígeno.
- (e) Aporte abundante de NADH y de O_2 , pero se le añade cianuro.



2- El consumo de O_2 fue medido en tres vasos de Warburg que contenían lo siguiente:

VASO A:	VASO B:	VASO C:
- mitocondrias de hígado de rata	- ídem A	- ídem A y B
- 21 μ moles de α -cetoglutarato	- + Hexoquinasa de levadura	- + 2,4- dinitrofenol
- 30 μ moles de fosfato	- + 35 μ moles de glucosa	
- ADP, citocromo c y $MgSO_4$		

Se graficaron las siguientes curvas con los resultados indicados. Explique las diferentes gráficas.



3- Un laboratorio farmacéutico envía muestras de dos inhibidores (A y B) para caracterizarlos como posibles antibióticos. Utilizando una preparación de mitocondrias de hígado incubada con piruvato, O_2 , ADP y Pi se observó lo siguiente:

Agregando a la preparación Inhibidor A se bloquea el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.

Una vez producida la inhibición se agrega a la mezcla el Inhibidor B y se observó que se restablecía el transporte electrónico pero no la fosforilación oxidativa.

- Como clasificaría estos inhibidores teniendo en cuenta su modo de acción en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa?
- Nombre inhibidores conocidos que podrían actuar del mismo modo.

4- El gráfico muestra el trazado obtenido en un oxígrafo al incubar partículas submitocondriales a $30^\circ C$ y a pH 7,5. Caracterice cada uno de los compuestos agregados (B,C, E, F, G, H). Justifique brevemente el efecto de cada compuesto sobre la velocidad de consumo de O_2 .

B: ADP + Pi u Oligomicina

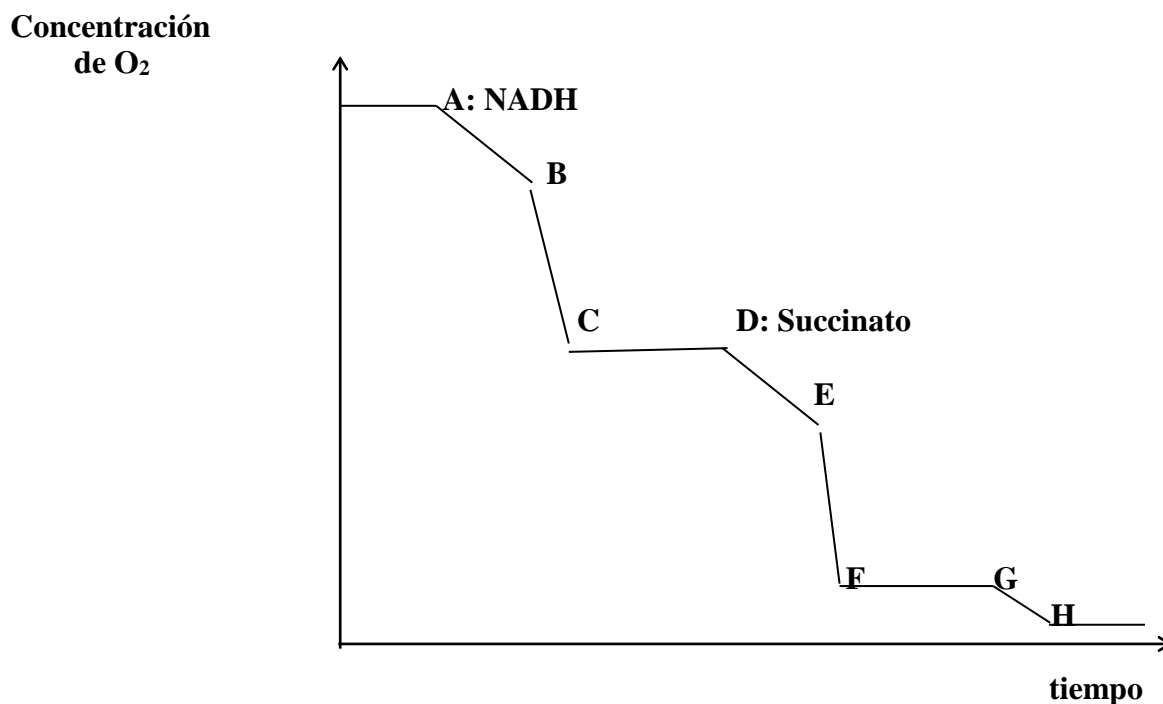
C: Rotenona o Antimicina

E: 2,4-DNF u Oligomicina

F: Malonato o Succinato

G: Malonato o Succinato

H: CN^- o Amital



5- En la década del '30 se empleó el dinitrofenol como producto para adelgazar. Los pacientes rápidamente lograban perder peso, sin embargo se observó que los efectos secundarios eran graves. Presentaban exudación profusa, fiebre incontrolable, pérdida de visión, daños en los riñones, en el hígado, e incluso descompensaciones graves que podían llevar a la muerte.

a) De acuerdo al mecanismo de acción de 2,4 DNF, explique la pérdida de peso que experimentan los pacientes.

b) Establezca la relación entre los síntomas que presentaban los pacientes con el consumo de 2,4-DNF.

GUÍA DE ESTUDIO**Transporte electrónico. Fosforilación oxidativa.**

Localización de las enzimas. Deshidrogenasas piridina-dependientes y flavina-dependientes, ubiquinona, citocromos. Clases de enzimas y transportadores. Complejos.

. ¿Cómo están ubicados respecto al valor de su potencial de reducción? ¿A qué nivel de la cadena actúan los inhibidores? ¿En qué estado (oxidado o reducido) se encuentran los intermediarios cuando actúan los inhibidores?

Centros de conservación de la energía para la fosforilación.

¿Dónde están ubicados los centros proveedores de energía para la fosforilación?

Acción de inhibidores y desacoplantes:

¿Cómo actúan las sustancias desacoplantes, los inhibidores del transporte y los ionóforos? Ejemplos de cada uno de ellos.

. En presencia de un desacoplante ¿qué ocurriría respecto a: la concentración de P_i , la velocidad de oxidación, transporte de electrones, producción de calor, concentración de ADP mitocondrial, relación P/O?

. Cuando un sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee FAD como grupo prostético ¿Cómo es la relación P/O en ausencia de inhibidores, en presencia de cada uno de los inhibidores conocidos por separado ó en presencia de desacoplantes?

¿Qué ocurriría si en el caso anterior el sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee NAD como coenzima?

Fosforilación oxidativa. Hipótesis quimiosmótica.

TRABAJO PRÁCTICO N°3

METABOLISMO. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. PARTE I

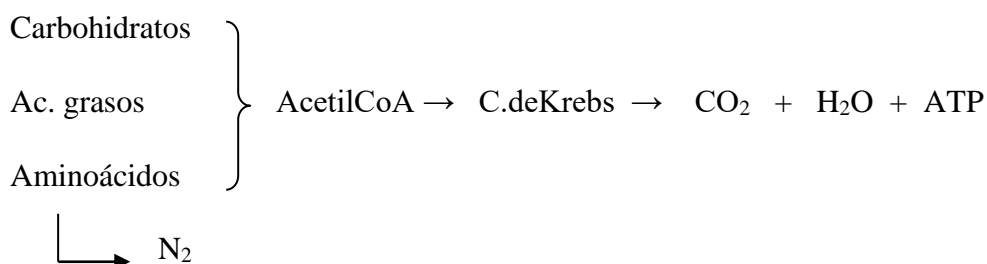
OBJETIVOS

Que el alumno sea capaz de comprender:

- Los procesos de catabolismo y anabolismo.
- Las reacciones enzimáticas, mecanismos de regulación, balance energético de la vía glicolítica.
- Los procesos de fermentación.
- Las reacciones de degradación y síntesis de glucógeno, regulación y control hormonal.

Metabolismo: Conjunto de todas las reacciones químicas que tienen lugar en las células y tejidos de los seres vivos. Se suele usar el término de Metabolismo Intermedio a las transformaciones que ocurren dentro de la célula. Las reacciones del proceso de digestión, previo a la absorción de sustancias en el tracto gastrointestinal, son consideradas reacciones pre-metabólicas.

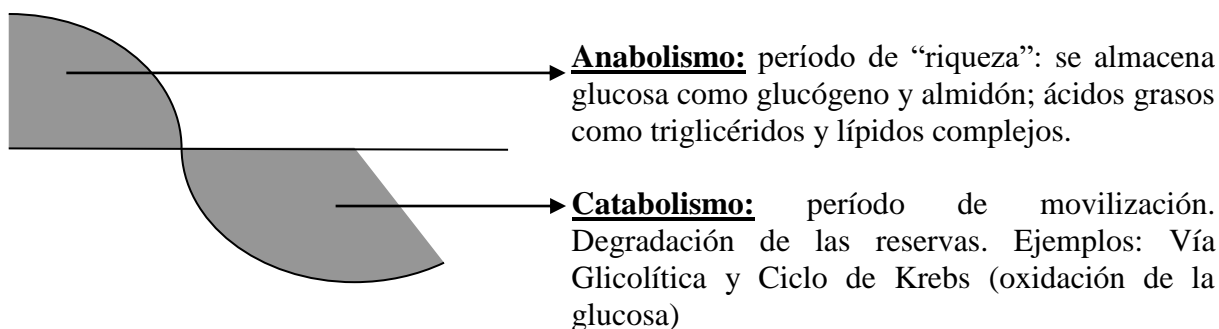
Catabolismo: Se conoce como catabolismo a la fase de degradación en la cual las moléculas orgánicas nutrientes se convierten en productos más pequeños y sencillos. En este caso se produce **energía libre** parte de la cual se conserva como ATP. Es un proceso que tiene naturaleza oxidativa en donde el NAD es el principal agente de transferencia de equivalentes de reducción. En general son rutas convergentes; por ejemplo:



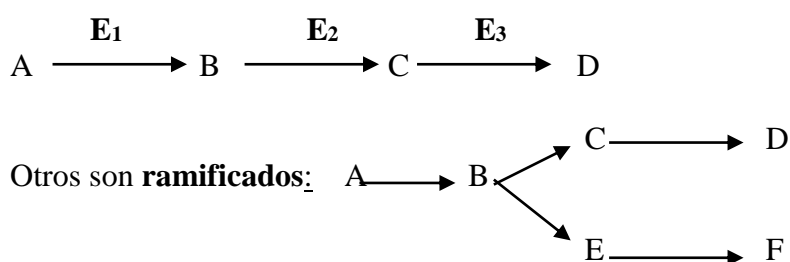
Anabolismo: Se denomina anabolismo a la fase de biosíntesis, en donde precursores sencillos y pequeños se integran a moléculas más grandes: polisacáridos a partir de glucosa. Son procesos o transformaciones endergónicas que utilizan ATP y liberan ADP + Pi.

Este hecho pone en evidencia el equilibrio dinámico que existe entre anabolismo y catabolismo.

A lo largo del día oscilamos entre dos períodos.



Las rutas metabólicas a veces son **lineales**, el sustrato inicial por acción de enzimas se convierte en reacciones subsiguientes en un producto final.



Algunas son **cíclicas**: uno de los componentes iniciales se regenera al final. Ejemplo: Ciclo de Krebs.

Regulación metabólica: Las rutas metabólicas están reguladas a tres niveles:

- 1) La forma de respuesta más inmediata es a través de las **enzimas alostéricas**, que pueden cambiar la actividad catalítica en respuesta a moduladores (estimuladores o inhibidores).
- 2) En organismos superiores, las **hormonas** coordinan las actividades metabólicas de diferentes tejidos.
- 3) Se relacionan con la **concentración de la enzima** a través del equilibrio entre la velocidad de síntesis y degradación de la misma.

METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

Los Hidratos de Carbono susceptibles de ser degradados por los microorganismos, plantas y animales, son numerosos y variados. En los **microorganismos** el almidón y la celulosa no pueden penetrar en la célula, son escindidos por las enzimas hidrolíticas excretadas por los microorganismos al medio: exoenzimas.

Nota: Las enzimas bacterianas se clasifican según su lugar de acción en: endoenzimas y exoenzimas. Las exoenzimas, son enzimas que siendo sintetizadas en el interior de la célula, para ejercer su función

deben ser exportadas al medio extracelular. Su función principal es degradar macromoléculas, las que por su tamaño no atraviesan las capas superficiales de la célula procariótica. Las endoenzimas, son aquellas enzimas que actúan en el interior de la célula. Ej. Oxidasas, reductasas y transaminasas. También se denominan endoenzimas a aquellas que hidrolizan uniones internas de las grandes macromoléculas, lo mismo que exoenzimas son las que cortan los extremos de las grandes macromoléculas.

En los **vertebrados**, los hidratos de carbono más frecuentemente ingeridos con la dieta son glucógeno, almidón, sacarosa, lactosa, glucosa y fructosa. El proceso de digestión comienza en la boca por acción de amilasa salival o ptialina, una endoenzima, que actúa hidrolizando las uniones α -1,4-glicosídicas, separando restos de maltosa. Una vez que el bolo alimenticio llega al estómago, el pH ácido del mismo inactiva la enzima, por lo que su acción es muy breve. Por acción del jugo gástrico que segrega el estómago, el bolo alimenticio se transforma en quimo (líquido espeso y ácido) Luego el quimo llega al duodeno. A través del conducto pancreático, se libera la amilasa pancreática (hidroliza uniones α -1,4-glicosídicas), la cual junto con la α -1,6-glucosidasa completa la hidrólisis de los polisacáridos. Los productos finales de la actividad de estas enzimas son maltosas, maltotriosas y dextrinas límites, las cuales son hidrolizadas hasta glucosa libre por acción de enzimas del borde en cepillo de la mucosa intestinal. Por ejemplo la isomaltasa cataliza la hidrólisis de uniones α -1,6 de la dextrina límite y α -1,4 en maltosa. Sobre los disacáridos actúan disacaridasas: maltasa, sacarasa, lactasa.

Los únicos hidratos de carbono que pueden ser absorbidos por las células de la mucosa intestinal son los monosacáridos. La glucosa y la galactosa comparten el mismo sistema de transporte en la membrana del borde en cepillo. Este sistema es llamado **SGLT1**, un transportador activo secundario dependiente de Na^+ . El sistema es impulsado por el gradiente de Na^+ creado por la Na^+ , K^+ -ATPasa situada en la membrana basolateral de los enterocitos.

Catabolismo de Hidratos de Carbono

Luego que la glucosa (6C) penetra a la célula, se oxida anaeróticamente para dar dos moléculas de piruvato (3 C), este proceso de oxidación se denomina Glucólisis o Vía de Embden-Meyerhof. Como los organismos vivos surgieron inicialmente en una atmósfera que carecía de O_2 la degradación anaeróbica de la glucosa es el tipo de mecanismo biológico más antiguo para obtener energía. Algunas levaduras, microorganismos anaeróbicos, células que carecen mitocondrias (como los eritrocitos) y el músculo en contracción durante ejercicio intenso, dependen totalmente de esta vía para obtener energía.

La secuencia de reacciones se ha conservado y son similares en vertebrados, levaduras y vegetales, sólo difiere de una especie a otra en algún detalle de regulación y el destino posterior del piruvato. En este tema consideraremos cada uno de los siguientes procesos:

Fermentación

Es un término general que indica degradación anaeróbica de glucosa u otro nutriente en los que el hidrógeno pasa finalmente a un aceptor orgánico de hidrógeno. El **oxígeno no interviene**. El hidrógeno que se encuentra en la célula en forma de $\text{NADH} + \text{H}^+$ puede ser transferido en condiciones anaeróbicas a distintos productos intermediarios normales o a algunos aceptores de hidrógeno especialmente sintetizados para eliminar el hidrógeno y así regenerar el NAD^+ . Estos compuestos orgánicos reducidos son segregados y se acumulan en el medio de cultivo.

Según sean los productos de secreción que predominan se diferencia la:

- Fermentación Alcohólica (Etílica)
- Fermentación Láctica
- Fermentación Propiónica
- Fermentación Fórmica
- Fermentación Butírica, etc

Las levaduras son organismos anaerobios facultativos, son organismos de respiración aeróbica, que en ausencia de oxígeno fermentan los Hidratos de Carbono formando CO_2 y etanol. Es decir el alcohol aparece como producto secundario.

VÍA GLICOLÍTICA

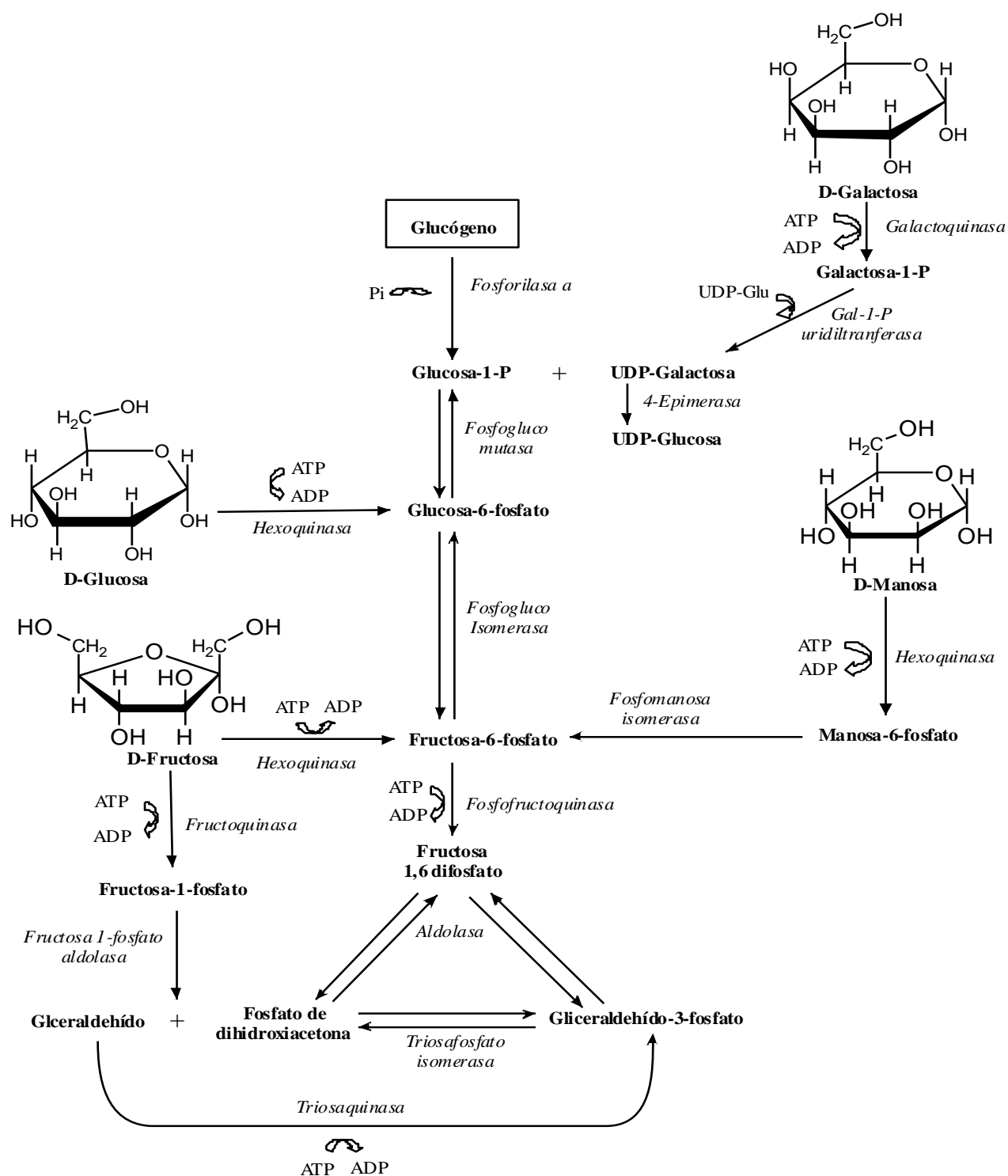
En los organismos aeróbicos, la **Vía Glicolítica o Glucólisis** es sólo la primera fase de un proceso (Ciclo de Krebs y Cadena Respiratoria) en donde queda atrapada gran parte de la energía contenida en los enlaces de los átomos que forman la glucosa.

La glucólisis se produce en el **citoplasma celular**. Las cinco primeras reacciones constituyen la **fase preparatoria**, donde se fosforila la glucosa y se incorporan a la vía las cadenas carbonadas de otros monosacáridos. En la **fase de generación de energía** se producen etapas de oxidorreducción y se conserva la energía en forma de ATP.

Todos los intermediarios están fosforilados y por consiguiente ionizados a pH 7 lo que les confiere carga negativa.

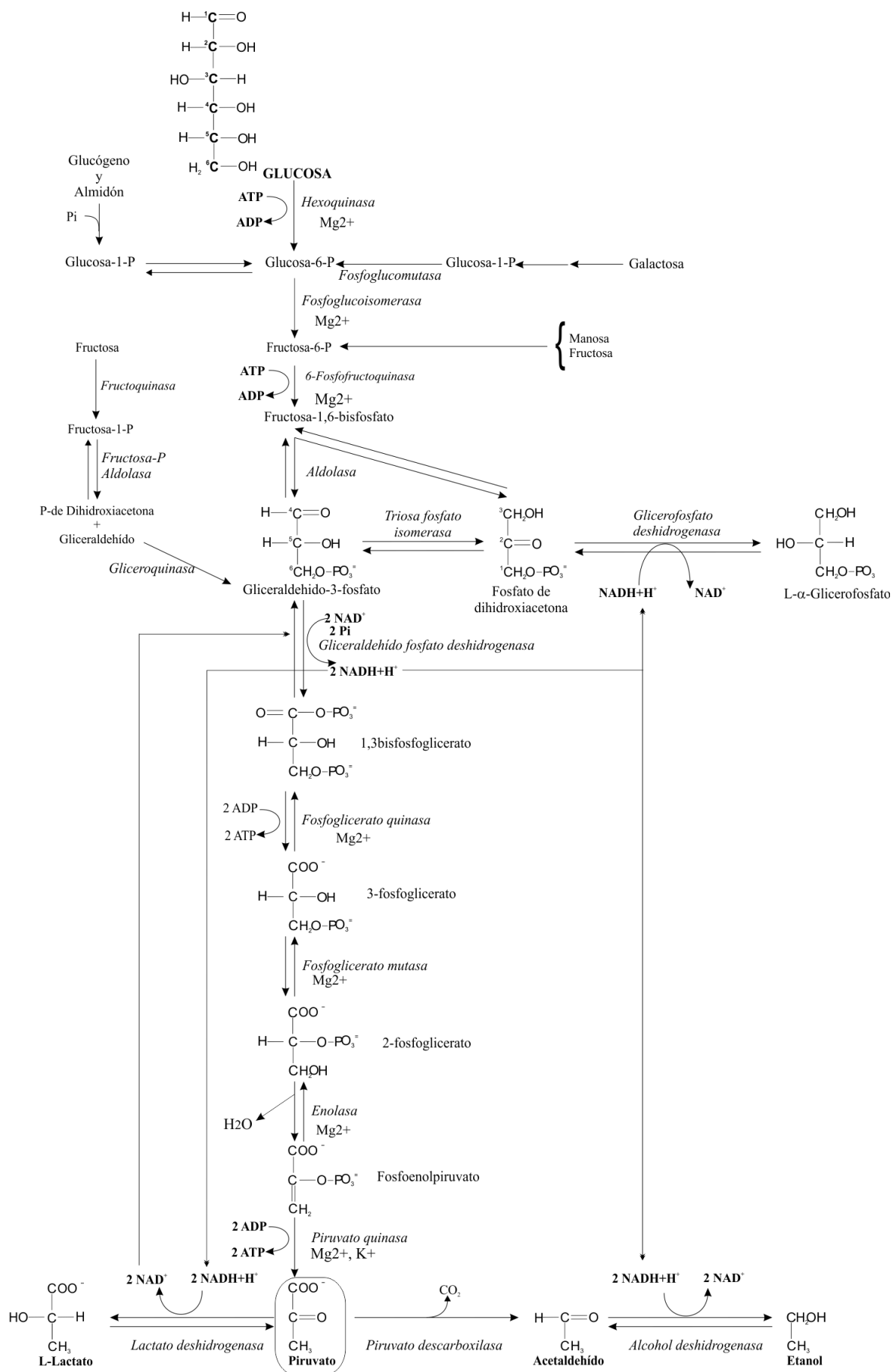
Rutas de “alimentación” que conducen desde glucógeno y otros carbohidratos a la vía glicolítica

Además de la glucosa, muchos carbohidratos se incorporan en último término a la secuencia glicolítica para experimentar degradación que rinde energía. Entre ellos tenemos: fructosa, galactosa y manosa (monosacáridos).



En la mayor parte de las células, las enzimas que promueven la glucólisis se hallan presentes en el citosol. Por el contrario, las enzimas de la fase aeróbica en la oxidación de carbohidratos, se hallan localizadas en la membrana interna y en la matriz mitocondrial de las células eucariotas.

ESQUEMA DE LA VÍA GLICOLÍTICA



Puntos de Regulación de la Glicólisis

Como en todas las rutas metabólicas la velocidad de la glicólisis está sujeta a control, el cual se realiza en tres etapas, donde están involucradas tres reacciones químicas irreversibles:

1° Punto de Control: A nivel de la *Hexoquinasa*. La actividad de la enzima es regulada por la concentración de su principal producto, la glucosa-6-fosfato, el cual inhibe su actividad.

2° Punto de Control: A nivel de la *Fosfofructoquinasa* la cual es una enzima alostérica, por lo tanto, su actividad es regulada por varios efectores. Su actividad es incrementada por **ADP, AMP, Fructosa 2,6-bisfosfato** y es inhibida por **ATP, NADH, Citrato y Ácidos grasos de cadena larga**. Este es el principal punto de control de la vía glicolítica.

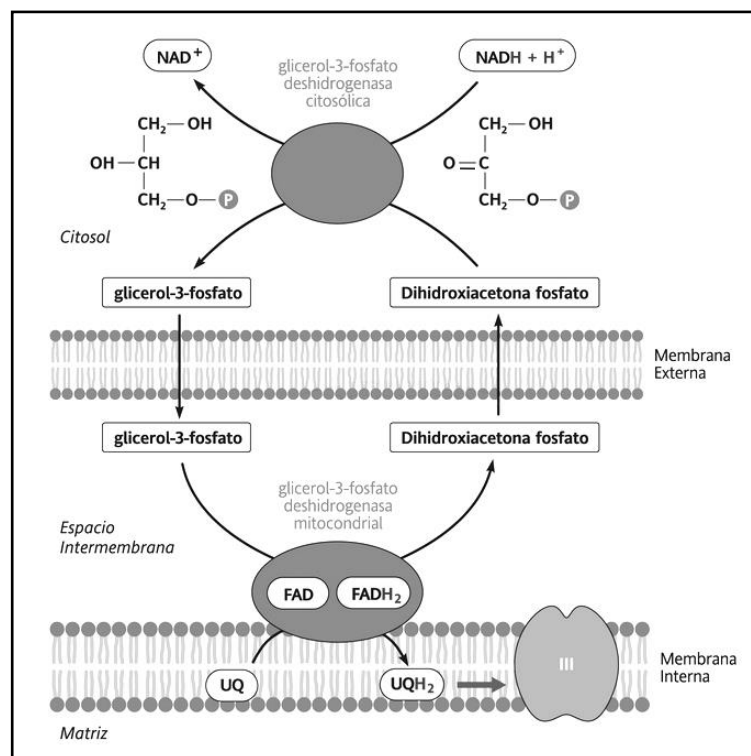
3° Punto de Control: A nivel de la *piruvato quinasa*. Es activada por **fructosa-1,6- bisfosfato** y es inhibida por el ATP, ácidos grasos y acetil CoA.

En condiciones aeróbicas, los equivalentes de reducción del $\text{NADH} + \text{H}^+$, que se generan en la reacción catalizada por *gliceraldehído fosfato deshidrogenasa* en el citosol, deben ser translocados al interior de las mitocondrias. Esta translocación se produce a fin de, por un lado, reoxidar el NADH para que la glucólisis pueda proseguir, y por otro, ceder dichos equivalentes a la cadena de transporte electrónico y obtener energía en forma de ATP. La impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna al NADH exige que la translocación de H desde el citosol a la cadena de transporte electrónico sea llevada a cabo por sistemas de lanzaderas o conmutadores de Hidrógeno, localizados en la membrana interna de las mitocondrias. Existen dos sistemas conocidos hasta ahora, la Lanzadera del Glicerofosfato, abundante en músculo esquelético y cerebro y la de Malato-Aspartato, muy activo en hígado, riñón y corazón.

Lanzadera de Glicerofosfato

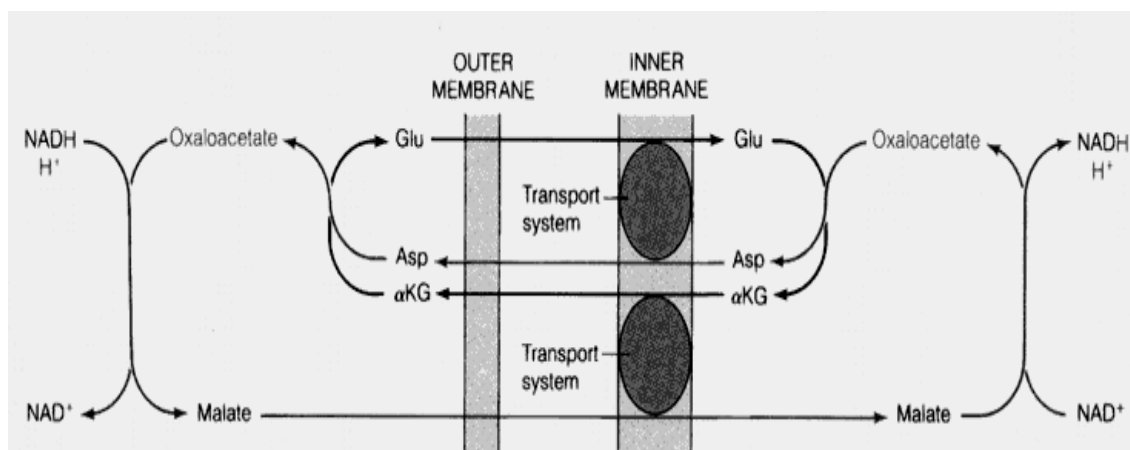
Este sistema conmutador está presente en músculo esquelético y en cerebro (Fig. 4.5):

- Dihidroxiacetona-P acepta los hidrógenos del NADH, reduciéndose a glicerol-3-P en una reacción catalizada por *Glicerofosfato Deshidrogenasa citosólica* (GPDH).
- El glicerol-3-P atraviesa la membrana externa de la mitocondria.
- En la cara externa de la membrana interna mitocondrial se ubica la enzima *Glicerofosfato Deshidrogenasa mitocondrial*, que cataliza la oxidación de glicerol-3-P a Dihidroxiacetona-P y transfiere los equivalentes de reducción al FAD unido a la enzima formándose FADH_2 .
- FADH_2 cede los equivalentes de reducción a la coenzima Q, de esta manera los equivalentes de reducción ingresan a la cadena respiratoria, por lo tanto el rendimiento será de 2 moléculas de ATP por cada par de electrones transferido a cadena respiratoria.



Lanzadera glicerol-fosfato. Feduchi, Blasco, Romero, Yañez. Bioquímica. 1° Edición.

Otro sistema conmutador de equivalentes de reducción es la llamada **lanzadera malato-aspartato**. Este sistema involucra la enzima *malato deshidrogenasa* mitocondrial que utiliza NAD^+ como aceptor de equivalentes de reducción por lo tanto el rendimiento será de 3 moléculas de ATP por cada par de electrones transferido a cadena respiratoria.



Balance energético de la oxidación de glucosa

Cuando la vía glicolítica tiene lugar en ausencia de O_2 (**anaerobiosis**), cada molécula de glucosa consume 2 ATP en la fase de preparación y produce por fosforilación a nivel de sustrato 4 ATP en la fase de beneficio, siendo el balance positivo de dos moles de ATP/glucosa.

<i>Gasto de ATP (mol de glucosa)</i>		
Glucosa	→ Glucosa-6P	-1 mol de ATP
Fructosa-6P	→ Fructosa-1,6 BiP	-1 mol de ATP
<i>Producción de ATP (mol de glucosa)</i>		
1,3-Bifosfoglicerato	→ 3-fosfoglicerato	+ 2 mol de ATP
Fosfoenolpiruvato	→ Piruvato	+ 2 mol de ATP
<i>Balance total</i>		2 mol de ATP

Balance energético de la Glucólisis. Modificado desde Blanco. Química Biológica. 8° Edición

Cuando hay adecuada provisión de oxígeno (**aerobiosis**), el NADH formado en la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato trasfiere los equivalentes de reducción desde el citosol a la cadena de transporte electrónico mitocondrial, mediante los denominados sistemas de lanzadera.

Por cada mol de glucosa generan dos moles de triosa-fosfato, y dos moles de NADH, entonces se producen **4 o 6 moles de ATP**, según la lanzadera utilizada. Estos sumados a los 2 moles de ATP de la glicólisis, dan un total de **6 u 8 moles ATP** por mol de glucosa en **condiciones aeróbicas**.

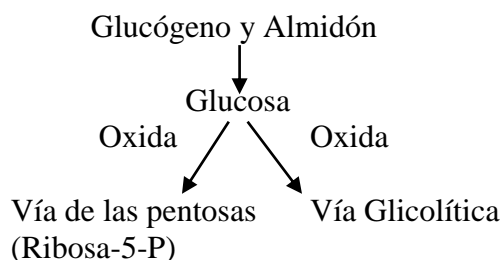
Efecto Pasteur

Louis Pasteur observó, cultivando levaduras, que el consumo de glucosa en un medio anaeróbico es considerablemente mayor que el observado en cultivos con abundante provisión de oxígeno. Esto se llamó “Efecto Pasteur”, el cual es un mecanismo de adaptación de las células, donde la velocidad de utilización de glucosa es ajustada a los requerimientos metabólicos de la misma.

El fenómeno, llamado **Efecto Pasteur**, permaneció sin explicación satisfactoria durante mucho tiempo. Los conocimientos sobre regulación alostérica de enzimas permitieron dilucidar los mecanismos por los cuales es posible adecuar la actividad glicolítica a las necesidades energéticas de las células. La producción de ATP a partir de glucosa puede llegar a ser **18 veces mayor** cuando se dispone de oxígeno que cuando se carece de él. El aumento de los niveles de ATP y citrato que se produce en **aerobiosis** inhibe a la *fosfofructoquinasa*, esto provoca la acumulación de los metabolitos de etapas anteriores, entre ellos la **glucosa-6-fosfato**. Esta inhibe a su vez la *hexoquinasa* y también el transporte de glucosa a través de la membrana. Se trata de efectos de retroalimentación, que contribuyen a disminuir la actividad glicolítica. Esto justifica por qué en **anaerobiosis** es necesario consumir mucha mayor cantidad de glucosa para obtener el mismo rendimiento de ATP que en **aerobiosis**.

SUSTANCIAS DE RESERVA

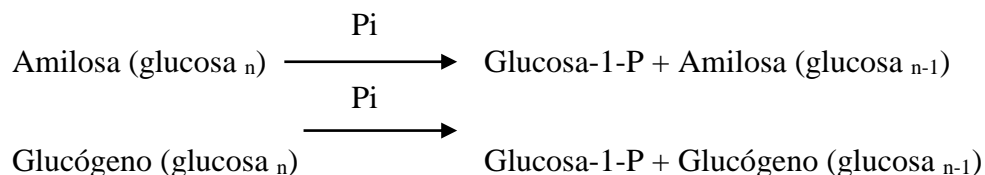
Las células de plantas, microorganismos y la de animales superiores pueden almacenar la glucosa en forma de polímeros (almidón y glucógeno, respectivamente)



Estas sustancias pueden actuar como fuente de carbono y de energía, de este modo prolongan la duración de la vida de las células en ausencia de fuente externa de energía. En plantas el almidón es el polisacárido de reserva predominante. El glucógeno parece presentarse en las bacterias con una frecuencia superior al almidón. También se ha probado su presencia en levaduras y otros hongos. En vertebrados el polisacárido de reserva es el glucógeno, este polisacárido se forma principalmente en dos tejidos: músculo e hígado. El tejido muscular va a utilizar las reservas de glucógeno para cubrir las necesidades propias, especialmente en los momentos de un ejercicio intenso. Mientras que el hígado almacena el glucógeno con la finalidad de mantener los niveles de glucosa en sangre. Esta resulta indispensable como fuente energética para el cerebro y las células con pocas mitocondrias o ninguna como los eritrocitos. El glucógeno es una forma de almacenamiento de glucosa fácil de movilizar a través del proceso denominado **glucogenólisis**.

GLUCOGENÓLISIS

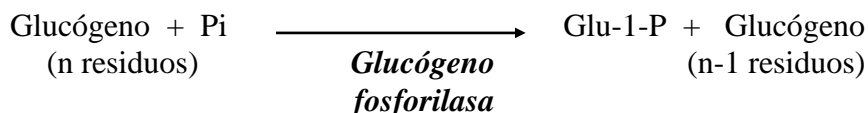
La degradación intracelular de estos polisacáridos se realiza mediante hidrólisis enzimática por enzimas llamadas *fosforilasas* que dan glucosa-1-P, la cual se incorpora a la Vía Glicolítica para degradarse y dar energía.



Las fosforilasas actúan a partir del extremo libre no reductor, liberando glucosa-1-fosfato hasta llegar a los puntos de ramificación, en donde interviene la **enzima desramificante**. Es un proceso que utiliza enzimas diferentes a la vía anabólica siendo la enzima reguladora la **glucógeno fosforilasa**.

La glucogenólisis por la acción secuencial de dos enzimas la **glucógeno-fosforilasa** y la **fosfoglucomutasa** produciéndose primero la eliminación secuencial de residuos de glucosa-1-fosfato del extremo no reductor de la molécula de glucógeno que se libera finalmente como glucosa-6-fosfato por acción de la **mutasa**.

La **glucógeno-fosforilasa** cataliza la reacción general:



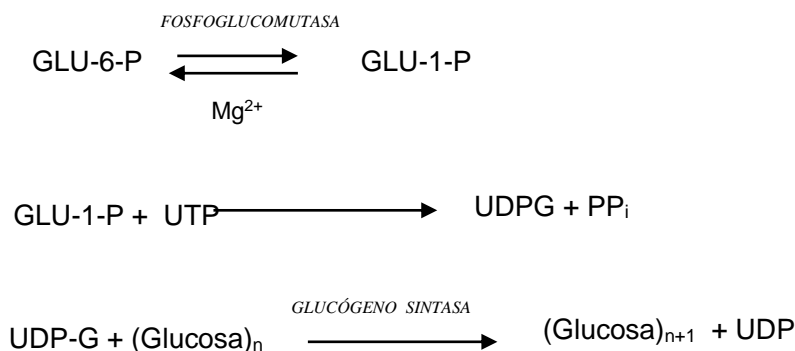
Esta enzima que se halla en el músculo e hígado, constituye en ejemplo importante de enzima regulador que está modulada por interconversión de sus formas activa e inactiva por modificación covalente de la molécula de enzima.

La Glucosa-1-P así formada puede degradarse hasta ácido láctico en el músculo o transformarse en glucosa libre en el hígado.

GLUCOGENOGÉNESIS

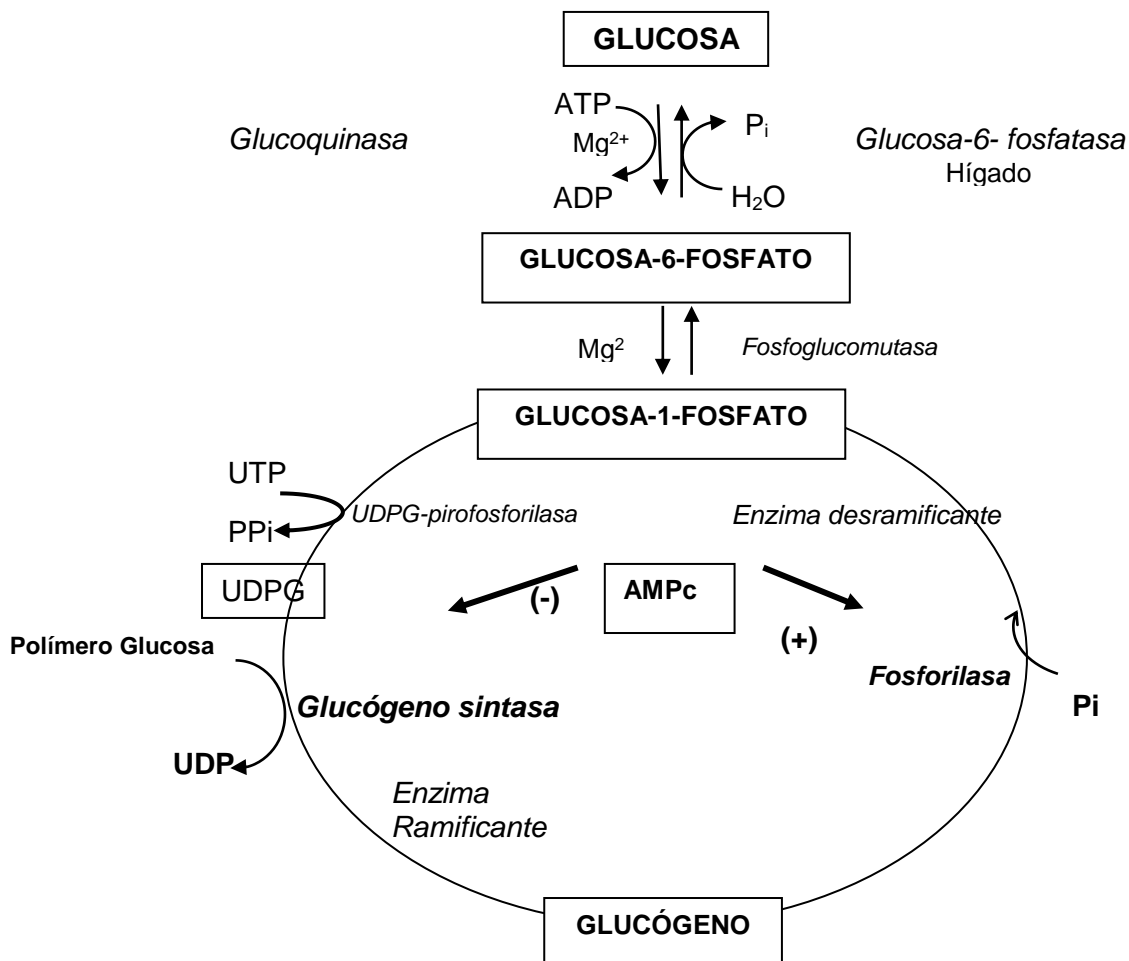
El glucógeno se sintetiza a partir de moléculas de glucosa. La formación de glucógeno se produce en el citosol, se realiza en muchos tejidos, principalmente hígado y músculo. Es un proceso anabólico que requiere energía aportada por el ATP y UTP (uridina trifosfato). Está regulado principalmente por la enzima *Glucógeno sintasa*. Mientras que la síntesis de glucógeno en el **hígado** se efectúa a través de **UDP-glucosa**, en la síntesis de almidón de las **plantas verdes** y en distintas **bacterias** participa **ADP-glucosa**.

La síntesis se inicia a partir de glucosa-1-P (G-1-P). Este compuesto es activado a UDP-glucosa (UDP-G) con nucleósido trifosfato (UTP) y es transferido a una cadena de glucosas preformadas.

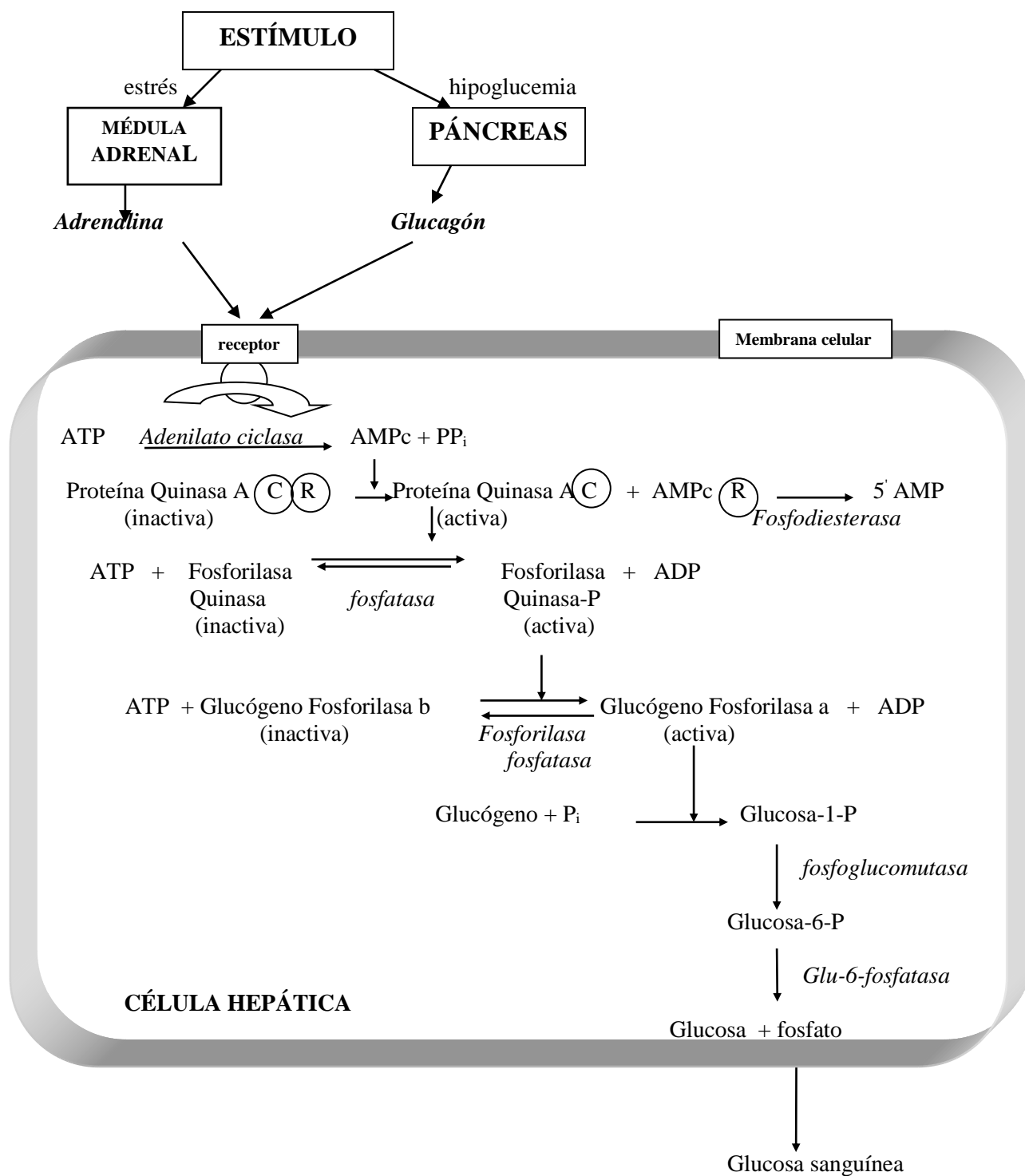


Regulación del metabolismo del glucógeno

La *glucógeno sintasa* y *glucógeno fosforilasa* están reguladas en forma recíproca por un ciclo de fosforilación-desfosforilación, cuando se estimula una enzima se inhibe la otra.



Estimulación hormonal de la degradación de glucógeno



(C) (R) : Centro catalítico regulador

(C) : subunidad catalítica.

(R) : subunidad reguladora.

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1- A varios medios de cultivo inoculados con levaduras se agregó glucosa en igual concentración. A los 3 min. se determinó la glucosa por el método de la glucosa oxidasa y los resultados fueron aprox. de 0,8 g/l. Posteriormente se agregó a cada uno, en forma individual, las sustancias que se detallan en la columna A y a los 30 min se determinó glucosa obteniéndose los resultados indicados en la columna B.

Una con una flecha los datos de la columna B con la columna A según lo esperado para el consumo de azúcar en cada condición. La concentración de glucosa en el tubo testigo a los 30 min. fue 0,20 g/l.

COLUMNA A	COLUMNA B (Glucosa g/l)
1.- Nada (Testigo)	0,75
2.- AsO_4^{3-}	0,20
3.- NaF	0,20
4.- Citrato	0,75
5.- $\text{AsO}_4^{3-} + \text{PO}_4^{3-}$	0,75
6.- Iodoacetato	0,10

2- En dos tubos diferentes se incubaron extractos celulares de músculo de conejo (tubo A) y de levaduras (tubo B) con fosfato y glucosa marcada isotópicamente con ^{14}C en forma uniforme, en un medio anaeróbico con azida sódica (NaN_3) a pH= 5 y 30° C. Las medidas de radiactividad, en alícuotas iguales de medio, antes de agregar las células ($t=0$) y luego de 1 hr. de incubación se muestran en la siguiente tabla:

	% <u>radiactividad</u>	
t (min)	tubo A	tubo B
0	100	100
60	99	65

- ¿Qué explicación encuentra para estos resultados?
- Construya una tabla con los valores teóricos de % de radiactividad que esperaría encontrar si el experimento se realizara en idénticas condiciones pero con 1- ^{14}C glucosa.
- Igual que b) pero con 3- ^{14}C glucosa.

3- A continuación se da una lista de enzimas que están ausentes en el catabolismo de hidratos de carbono y una segunda lista de posibles consecuencias de tales efectos:

Justificar las respuestas.

Enzimas ausentes

- Fosfofructoquinasa
- Fosfoglucomutasa

- c) Triosafosfato isomerasa
- d) UDP-Gal-4- epimerasa
- e) Glucógeno fosforilasa quinasa
- f) Glucógeno fosforilasa fosfatasa

Consecuencias

- 1) Incapacidad para utilizar galactosa como fuente de energía sin ningún efecto sobre la capacidad para utilizar glucógeno.
- 2) Incapacidad para utilizar el glucógeno o galactosa como fuente de energía.
- 3) Capacidad disminuida para obtener energía de los carbohidratos.
- 4) Evita el uso de la mayor parte de los carbohidratos para la producción de ATP.
- 5) Una disminución en el nivel normal del estado estacionario del glucógeno.
- 6) Incapacidad para utilizar glucógeno como fuente de energía sin ningún efecto sobre la capacidad para utilizar galactosa.

Ubique cada enzima con la consecuencia más probable (solamente una) de la segunda lista.

INTEGRACION DE LAS VIAS METABÓLICAS

En base a los siguientes criterios clave complete el cuadro con las vías indicadas, así logrará tener una visión en conjunto de cada una de ellas.

	GLICÓLISIS	GLUCOGENOLISIS	GLUCOGENOGENESIS
Criterios claves Cual es la función de la vía. Indique el sustrato, el producto y otros compuestos de interés.			
Localización En particular tejidos o células del organismo			
Compartimentalización Lugar del proceso en el interior de la célula.			
Etapas globales de la vía y principales puntos de control.			

GUIA DE ESTUDIO**Vía glicolítica.**

- Esquema con fórmulas de las reacciones, enzimas y cofactores.
- ¿En qué lugar de la célula se encuentran las enzimas que catalizan las reacciones de la vía glicolítica?
- Acción de la hexoquinasa y de la glucoquinasa: Sustrato sobre el cual actúan, producto de la reacción que catalizan. Diferencia en los valores de K_m .
- ¿Cuáles son los monosacáridos mas comunes que pueden ingresar a la vía glicolítica?

Regulación.

- ¿Qué compuestos activan o inhiben las tres enzimas que intervienen en la regulación?
- Balance energético.
- Destino del piruvato.
- Distintos tipos de fermentaciones.
- Sustancias de reserva.
- Diga cómo se degrada y cómo se pueden sintetizar.

Glucogenólisis:

Degradación de glucógeno en el hepatocito:

- a) ¿Cómo actúa la glucógeno fosforilasa y cuáles son los productos de la reacción?
- b) ¿Qué enzima actúa sobre las uniones α -1,6- glucosídicas de los puntos de ramificación?
- c) ¿Cuál es la enzima que da como producto glucosa-6-fosfato?
- d) ¿Qué enzima es activada en presencia de adrenalina y qué efecto tiene el producto de la reacción que cataliza?
- e) ¿Qué acción tiene sobre la glucogenólisis a nivel del hepatocito un aumento de la concentración de glucagón en sangre?
- f) ¿Qué reacción cataliza y en qué órgano se encuentra la glucosa 6-fosfato fosfatasa?

Glucogenogénesis:

Reacciones que participan en la síntesis de glucógeno

TRABAJO PRÁCTICO N°4**METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. PARTE II
CICLO DE KREBS. VÍA DE LAS PENTOSAS. CICLO DEL GLIOXILATO****OBJETIVOS**

Que el alumno adquiera los conocimientos que le permitan comprender:

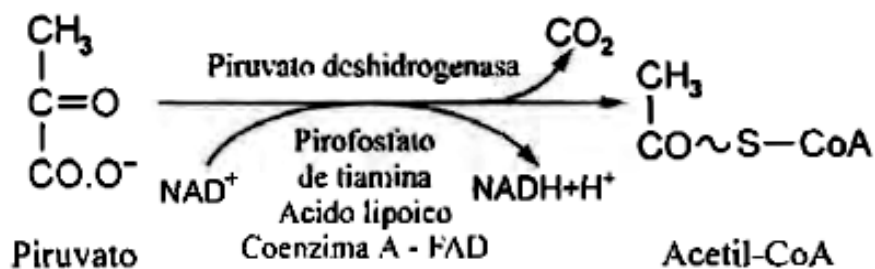
- La secuencia de reacciones que integran el Ciclo de Krebs, enzimas, puntos de regulación, balance energético.
- La secuencia de reacciones que integran la Vía de las Pentosas, enzimas, destino de los productos (NADPH, Ribosa 5-fosfato), interrelaciones con la Vía Glicolítica.
- La secuencia de reacciones que integran el Ciclo de Glioxilato

CICLO DE KREBS

El Ciclo de Krebs o Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos, es una secuencia de reacciones que constituye la ruta central común para la degradación de los restos carbonados que, en forma de Acetil-Coenzima A, derivan del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. El Ciclo está catalizado por un sistema multienzimático que acepta como combustible al grupo acetilo de la Acetil-coenzima A (Acetil-CoA), degradándolo hasta CO_2 y pares de H^+ y e^- . Estos últimos son conducidos a través de una cadena de transportadores de hidrógenos y electrones (Cadena Respiratoria), hasta el O_2 , aceptor final, que se reduce y forma H_2O . Estas secuencias de reacciones enzimáticas tienen lugar en los organismos **aerobios** y ocurre en la **matriz mitocondrial**.

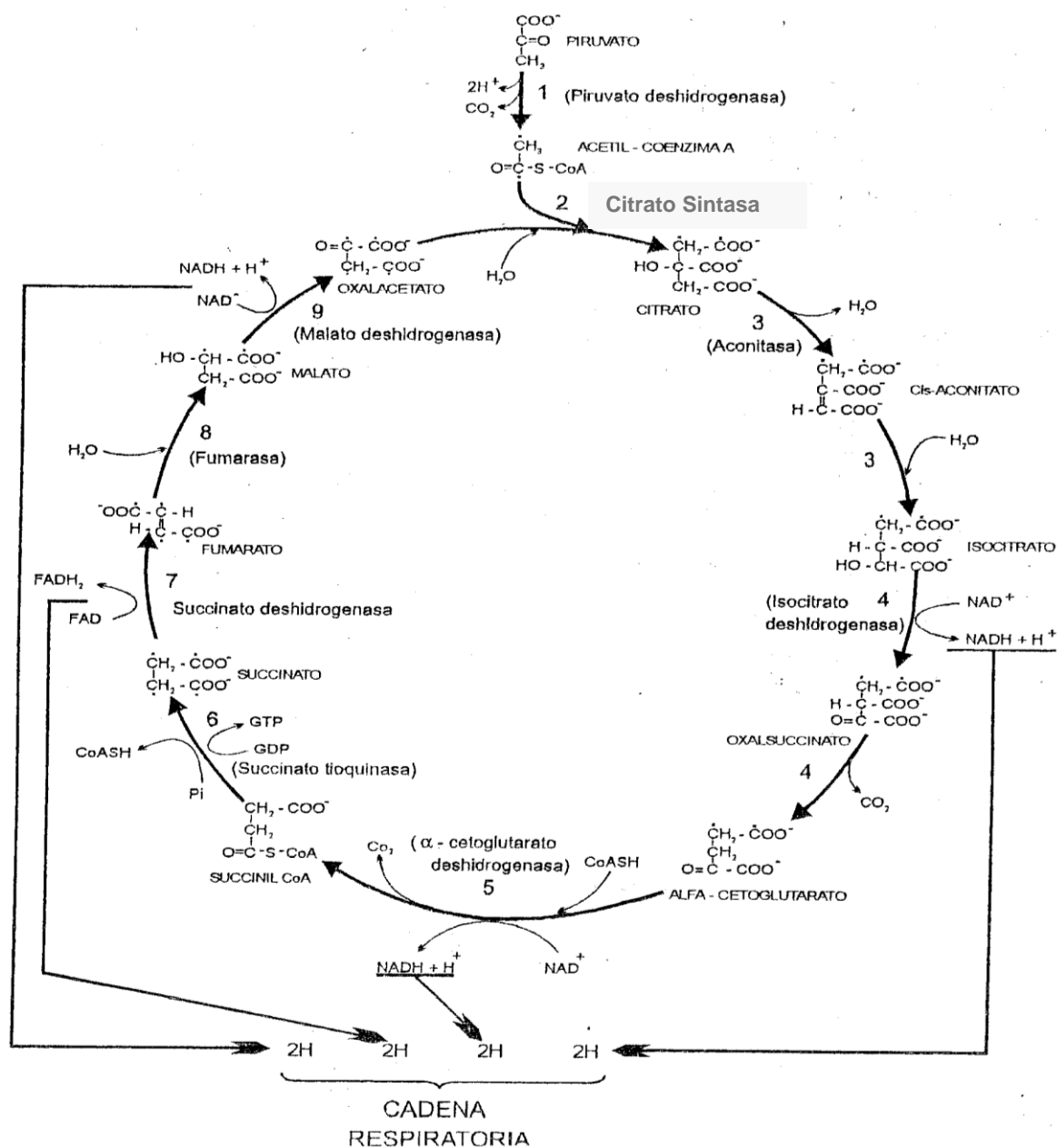
Descarboxilación Oxidativa de Piruvato

El piruvato obtenido en la vía glicolítica en el citosol, en condiciones aeróbicas ingresa a la matriz mitocondrial a través de un transportador de la membrana interna de estas organelas, donde será metabolizado a acetil CoA por el complejo multienzimático de la *Piruvato deshidrogenasa*. Este complejo está constituido por tres enzimas: *Piruvato descarboxilasa* o E_1 , *Dihidrolipoil transacetilasa* o E_2 , y *dihidrolipoil deshidrogenasa* o E_3 , y requiere de cinco coenzimas: pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, coenzima A, FAD y NAD.



El NADH producido en esta reacción transfiere los electrones a la cadena respiratoria donde se unen a oxígeno para dar agua, en el proceso se obtienen 3 ATP.

CICLO DE KREBS



Regulación del Ciclo de Krebs

Indirectamente, el Ciclo de Krebs está controlado por el complejo de la *piruvato deshidrogenasa*. Este complejo responde a dos mecanismos diferentes de regulación:

- **Alostérica:**

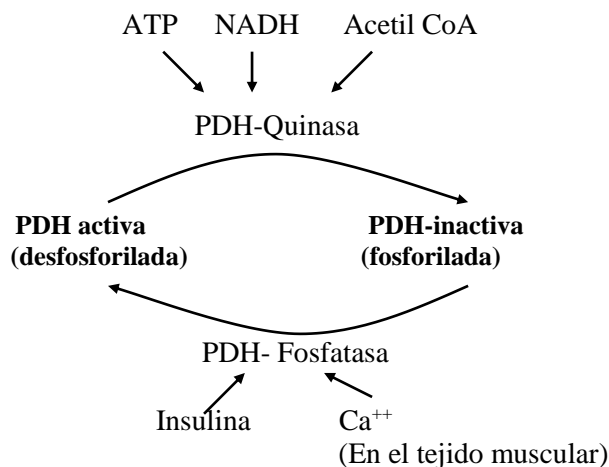
Moduladores negativos: ATP, Acetil-CoA, NADH, ácidos grasos de cadena larga.

La actividad de la enzima disminuye cuando las relaciones ATP/ADP y NADH/NAD⁺ son altas.

Moduladores positivos: AMP, NAD⁺, Ca²⁺ (en músculo)

- **Regulación por modificación covalente:**

El complejo es inhibido por ATP, Acetil-CoA y NADH y es estimulado por insulina y el Ca⁺⁺ (este último aumenta en el ejercicio muscular intenso y estimula la fosfatasa).



El funcionamiento del ciclo depende del flujo de átomos de carbono en el ciclo y esto depende de la conversión de Piruvato en Acetil-CoA (reacción catalizada por *piruvato deshidrogenasa*) y por la entrada al ciclo de Acetil-CoA (este también puede provenir de la oxidación de ácidos grasos y del catabolismo de algunos aminoácidos).

Los tres factores que gobiernan el flujo de carbonos a través del Ciclo de Krebs son:

- Disponibilidad de sustrato.
- Inhibición del ciclo por acumulación de producto.
- Retroinhibición alostérica de enzimas que catalizan las primeras etapas del ciclo.

Los principales sitios de regulación son pasos fuertemente exergónicos y son los catabolizados por *citrato sintasa*, *isocitrato deshidrogenasa* y *α-cetoglutarato deshidrogenasa*.

1° punto de control: *Citrato sintasa*

La actividad de la enzima es regulada por la disponibilidad de sustrato (Acetil-CoA y Oxalacetato).

Responde a los siguientes reguladores:

- Inhibidores: succinil-CoA (compite con Acetil-CoA por el sitio activo), citrato y ATP
- Activadores: ADP.

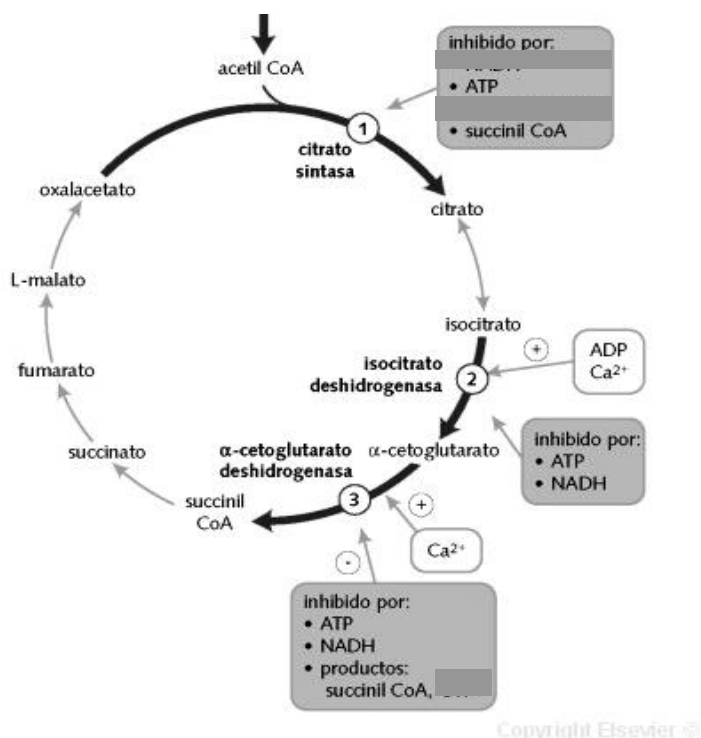
2° punto de control: *Isocitrato deshidrogenasa*

- Inhibidores: ATP y NADH. La actividad de la enzima es fuertemente regulada por los niveles de NADH (cuando la relación NADH/NAD^+ es alta la enzima se inhibe).
- Activadores: Ca^{2+} (en músculo)

3° punto de control: α -cetoglutarato deshidrogenasa

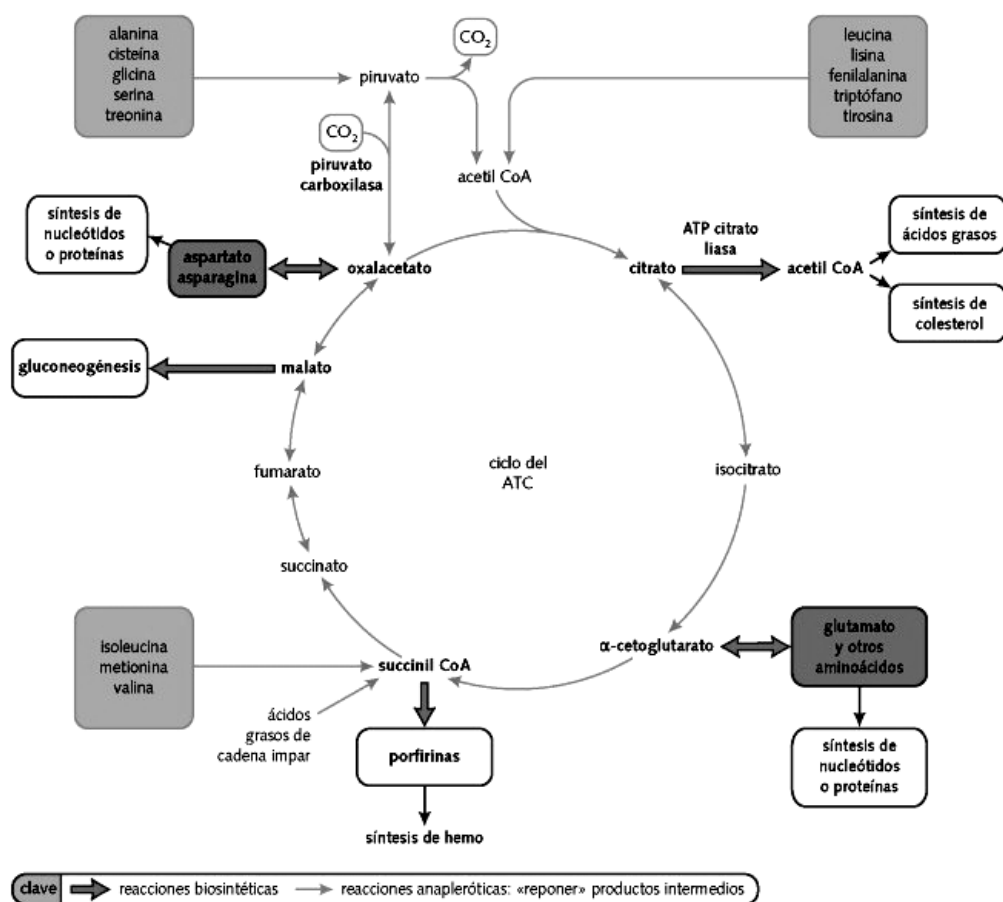
- Inhibidores: relación NADH/NAD^+ elevada, succinil-CoA
- Activadores: Ca^{2+} (en músculo)

Valores elevados en la relación NADH/NAD^+ limitan la reacción catalizada por *malato deshidrogenasa* (no es reguladora del ciclo) lo que lleva a disminución de la concentración de oxalacetato, afectando su disponibilidad para la primer enzima del ciclo.



Extraído de "Metabolismo y nutrición". Benyon, S. Harcourt Brace, 1998.

Función anfibólica del Ciclo de Krebs



Copyright Elsevier

Extraído de "Metabolismo y nutrición". Benyon, S. Harcourt Brace, 1998.

Varios de los intermediarios del Ciclo están relacionados con otras vías metabólicas, sirviendo de puntos de entrada de sustratos al Ciclo y asegurando una adecuada concentración de intermediarios. A su vez, estas relaciones metabólicas posibilitan el aporte de intermediarios del Ciclo de Krebs, que actúan como precursores en distintos procesos anabólicos. El Ciclo es, por lo tanto, una **vía anfibólica**.

CICLO DEL GLIOXILATO

Es una forma modificada del Ciclo de Krebs, tiene lugar en la mayor parte de las plantas y microorganismos, pero no ocurre en los animales superiores. El objetivo primordial del ciclo del glioxilato es el de permitir a las plantas y a los microorganismos, la utilización de los ácidos grasos o del acetato, en forma de acetil CoA, como única fuente carbonada, sobre todo para la biosíntesis de glúcidos a partir de los ácidos grasos.

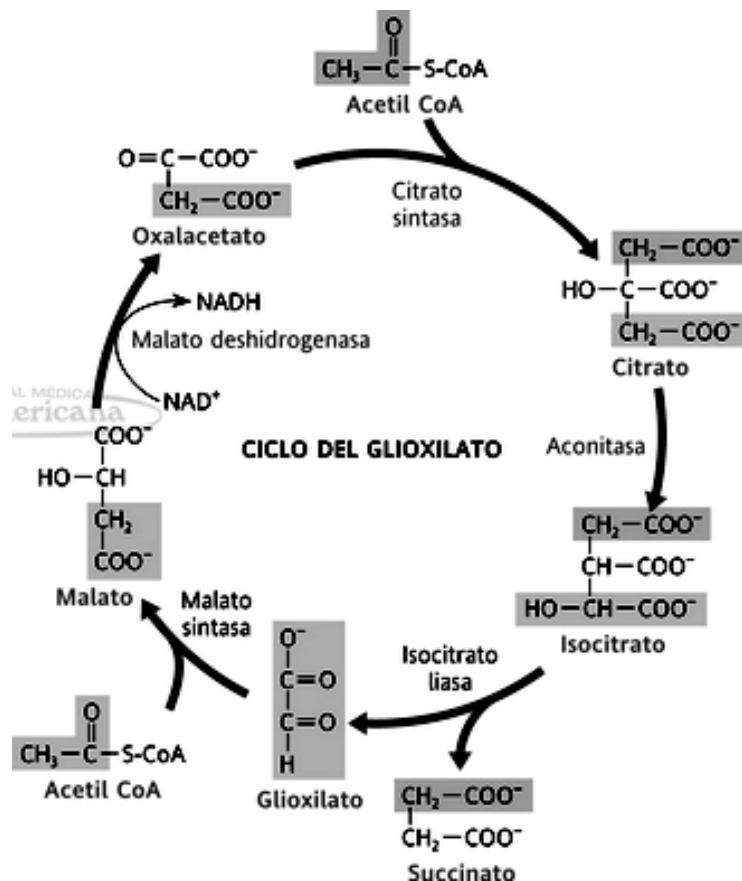
El isocitrato es escindido en primer lugar por la **isocitrato liasa** para formar succinato y glioxilato. La **malato sintasa** cataliza a continuación la condensación del glioxilato con otra molécula

de acetil CoA para formar malato. El malato se oxida entonces a oxalacetato, que puede condensarse de nuevo con la acetil-CoA e iniciar otra vuelta del ciclo del glioxilato.

A cada vuelta del ciclo se incorporan dos moléculas de acetil-CoA y se forma una molécula de succinato. Este último se emplea con fines biosintéticos, particularmente como precursor en la gluconeogénesis, es decir, en la biosíntesis de “nuevo” azúcar.

Aunque las reacciones del ciclo de Krebs en las plantas superiores se hallan localizadas en las mitocondrias, las dos enzimas características del ciclo del glioxilato, la *isocitrato liasa* y la *malato sintasa* se encuentran en otra clase de organelas citoplasmáticas, los **glioxisomas**. Estas organelas rodeadas de membrana carecen de la mayor parte de las enzimas del ciclo de Krebs y no poseen sistema citocrómico. Se encuentran solamente en las células vegetales capaces de convertir a los ácidos grasos en azúcar.

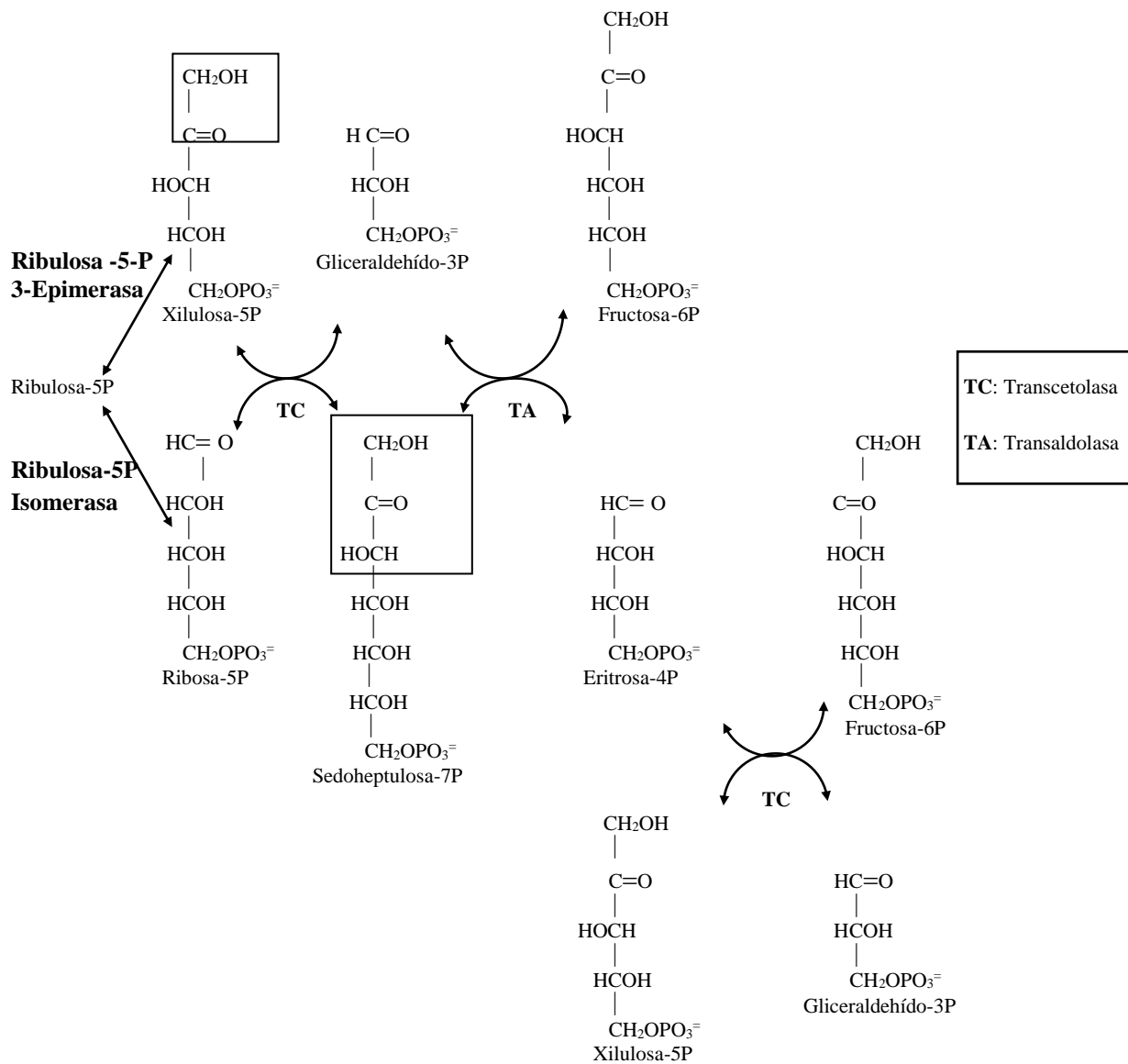
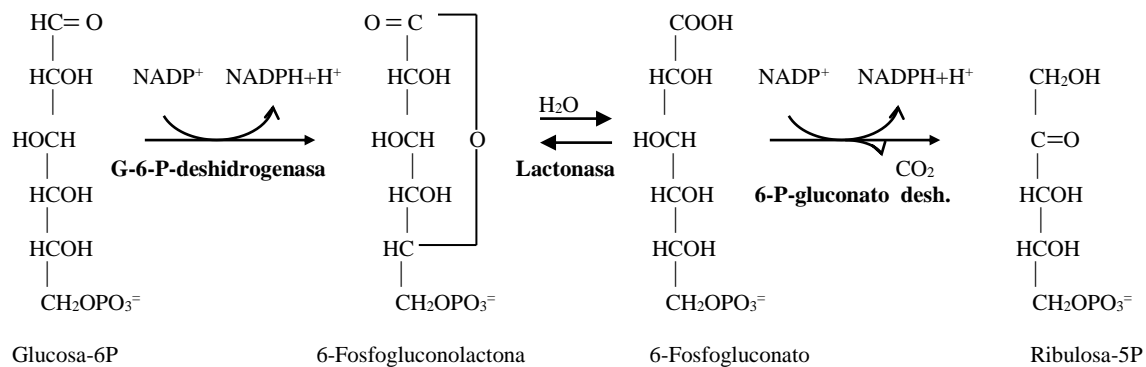
El ciclo del glioxilato reviste especial importancia en las semillas de oleaginosas (lino, girasol), las que presentan reservas de triglicéridos en forma de aceites, cuyos ácidos grasos deben ser convertidos en carbohidratos durante el proceso de germinación. No ocurre en los animales que no pueden efectuar la síntesis neta de glucosa a partir de restos acetilos provenientes de ácidos grasos.



VÍA DE LAS PENTOSAS

La **glucosa-6-fosfato** puede catabolizarse por una ruta alternativa, la **Vía de las Pentosas**. Dentro de los objetivos fundamentales de esta vía está la formación de **NADPH**, utilizado principalmente en la síntesis de ácidos grasos y esteroides, como así también la producción de **ribosa-5-fosfato**, necesaria para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

Esta ruta posibilita también la interconversión de carbohidratos de 3, 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono, relacionándolos con la vía glicolítica.



PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1- Señálese la posición del carbono isotópico en el ácido cítrico, cuando se incuban los siguientes compuestos marcados isotópicamente:

2-

a) 3-¹⁴C –Piruvato

b) 2-¹⁴C- Piruvato

c) 5-¹⁴C- Fructosa-6-fosfato

3- ¿Cuál es el rendimiento en ATP cuando cada uno de los siguientes sustratos es oxidado completamente a CO₂ por un homogenato celular? Supóngase que la glicólisis, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa son completamente activos.

4-

a) Piruvato.

b) Lactato.

c) Fructosa-1,6-difosfato.

3- Se desea realizar un experimento para determinar el funcionamiento de la Vía de las Pentosas, utilizando glucosa marcada con ¹⁴C ¿en qué posición colocaría la marca para que aparezca solamente en un producto exclusivo de la Vía de las Pentosas y no de la Vía glicolítica? Considerar que no funciona el ciclo de Krebs.

4- Se incubó glucosa-6-fosfato marcada con ¹⁴C en C₆ con una suspensión de eritrocitos en presencia de un potente inhibidor de la fosfoglucoisomerasa. Al cabo de un tiempo se detectó la presencia de piruvato ¹⁴C.

Esquematice las reacciones que llevan a la producción del mismo señalizando el carbono marcado.

5- Se aislaron eritrocitos de la sangre de un individuo normal y de un paciente con deficiencia de tiamina. Las células fueron incubadas con buffer conteniendo 1-¹⁴C-glucosa y se determinaron las cantidades de ¹⁴CO₂ y ¹⁴C-láctico formados al cabo de 1 hora. Analice los resultados obtenidos que se indican en la tabla y justifique la disminución de CO₂ para el individuo deficiente.

Productos	% de ¹⁴ C en productos	
	Individuo Normal	Individuo Deficiente
CO ₂	10,4	1,7
Láctico	80,0	98,0

INTEGRACIÓN DE LAS VÍAS METABÓLICAS ESTUDIADAS

	CICLO DE KREBS	VIA DE LAS PENTOSAS
Criterios claves Cual es la función de la vía. Indique el sustrato, el producto y otros compuestos de interés.		
Localización En particular (tejidos o células del organismo)		
Compartimentalización Lugar del proceso en el interior de la célula.		
Etapas globales de la vía y principales puntos de control.		
Mencione la relación con otras vías metabólicas		

GUÍA DE ESTUDIO**Ciclo de Krebs:**

- ¿En qué lugar de la célula se llevan a cabo las reacciones del C. de Krebs?
- Formular todas las reacciones del ciclo nombrando las enzimas y coenzimas.
- En cada una de las reacciones de tipo redox ¿Qué compuesto se oxida y cual se reduce?
- ¿Cuántos moles de ATP se produce por degradación de: AcetilCoA y Piruvato?
- ¿Cuál es el aceptor de electrones en cada reacción de oxidación?
- ¿Cuáles son las enzimas que intervienen en la regulación del C. de Krebs?
- ¿Qué intermediarios del ciclo pueden servir como precursores de otras vías metabólicas?

Ciclo Glioxilato

- Localización celular En que tipo de organismos ocurre y cual es su objetivo.

Vía de las Pentosas

- Reacciones, enzimas y cofactores. Formular.
- ¿Cuál es el mecanismo de acción de la transaldolasa y transcetolasa? ¿En qué reacciones actúan estas enzimas? ¿Cuáles son las enzimas de la parte oxidativa? ¿En que reacciones se produce NADPH? ¿Qué vías metabólicas lo pueden utilizar?
- ¿Qué reacciones catalizan las enzimas epimerasa y isomerasa? ¿Cómo actúa el pirofosfato de tiamina?- - En la reacción de oxidación de glucosa-6-fosfato ¿Cuáles son los productos de reacción?
- ¿Qué intermediarios de la vía glicolítica se producen en esta vía? ¿En qué órganos y tejidos es mas activa esta vía?

TRABAJO PRÁCTICO N° 5**METABOLISMO DE LÍPIDOS
BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS****OBJETIVOS**

Que el alumno adquiriera los conocimientos que le permitan:

- Comprender el proceso de obtención de energía de los ácidos grasos por beta oxidación, reacciones involucradas, localización intracelular, enzimas, cofactores, regulación, balance energético.
- Conocer la vía de síntesis de ácidos grasos, precursores, reacciones, enzimas, regulación, localización intracelular, reacciones de elongación y desaturación

INTRODUCCIÓN

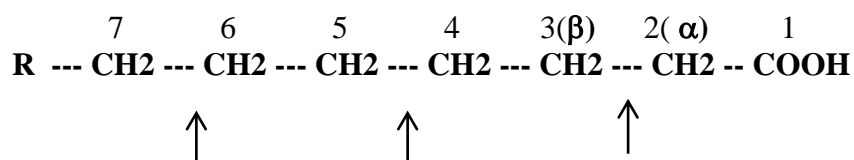
Los lípidos del organismo, al igual que los hidratos de carbono, se hallan en un estado metabólico dinámico, ya que sufren constantemente cambios en las diversas células del cuerpo. Los lípidos comprenden una amplia variedad de sustancias químicas, tales como triglicéridos, ácidos grasos y derivados, fosfolípidos, glucolípidos, etc. Constituyen más del 10 % del peso corporal de un individuo adulto y aproximadamente el 40 % de las calorías de la alimentación diaria.

En general son importantes como: 1) fuente de energía, 2) manto térmico, pues su presencia en el tejido subcutáneo aísla al cuerpo contra la pérdida de calor, 3) estructura de las membranas celulares, 4) estructura de caracteres sexuales secundarios.

Las grasas producen por oxidación el doble de energía (9 Kcal/g) que los hidratos de carbono o las proteínas (4 Kcal/g).

DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

En los mamíferos, el centro principal de acumulación de triglicéridos es el citoplasma o vacuolas citoplasmáticas de las células del tejido adiposo. El primer paso en la utilización de las grasas como fuente de energía es la hidrólisis de los triglicéridos por acción de lipasas. Los ácidos grasos liberados de los triglicéridos se activan en el **citosol** y son transportados a través de la **membrana mitocondrial interna**, conjugados con **carnitina**, hasta la **matriz mitocondrial** donde se produce la oxidación. El sistema comprende dos enzimas: la *carnitina acil transferasa I y II*. Los ácidos grasos de cadena larga se oxidan a CO₂ y H₂O en casi todos los tejidos de vertebrados. El músculo cardíaco obtiene la mayor parte de su energía de la oxidación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos se degradan por eliminación oxidativa sucesiva de dos carbonos a partir del extremo carboxílico en un proceso denominado **β-oxidación**.



Se produce la oxidación del carbono beta por eso se denomina β -oxidación. El Acetil CoA liberado entra al ciclo de Krebs para terminar de oxidarse a CO_2 y H_2O .

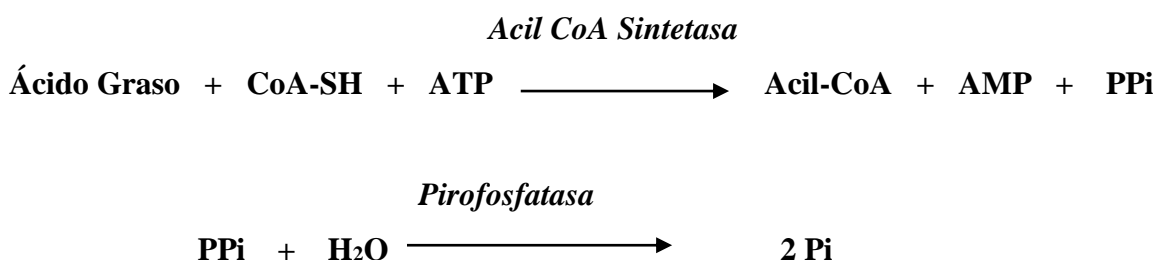
Activación y Transporte

Para que una molécula de ácido graso pueda ser transferida al interior de la mitocondria y degradada, debe ser activada en el citosol por *tioquinasas* o *Acil CoA sintetisas* que sintetizan Acil-CoA. Existen tres enzimas diferentes siendo cada una de ellas específica para un intervalo de longitud de cadena del ácido graso:

- 1- Activadoras de ácidos grasos de cadena corta: acético, propiónico.
- 2- Activadoras de ácidos grasos de cadena intermedia (entre 4 y 12 átomos de carbono).
- 3- Activadoras de ácidos grasos de cadena larga (más de 12 átomos de carbono), por ej. Ácido palmítico, Ácido oleico, Ácido esteárico.

Las dos últimas activan tanto ácidos grasos saturados como insaturados. Las tres enzimas tienen idéntico mecanismo de reacción.

Reacción Global



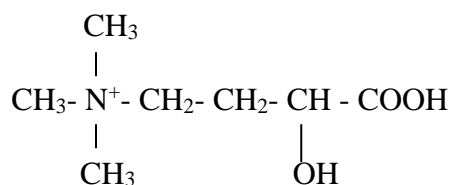
La reacción es irreversible debido a que la hidrólisis del PPi asegura que el equilibrio se desplace hacia la formación de Acil-CoA. En esta reacción está implicado un intermediario unido a la enzima, que es un anhídrido mixto: Acil-AMP o Acil adenilato que le permite generar después una unión tioéster de elevada energía.

El efecto neto es la utilización o consumo de 2 enlaces ricos en energía del ATP para activar una molécula de ácido graso.

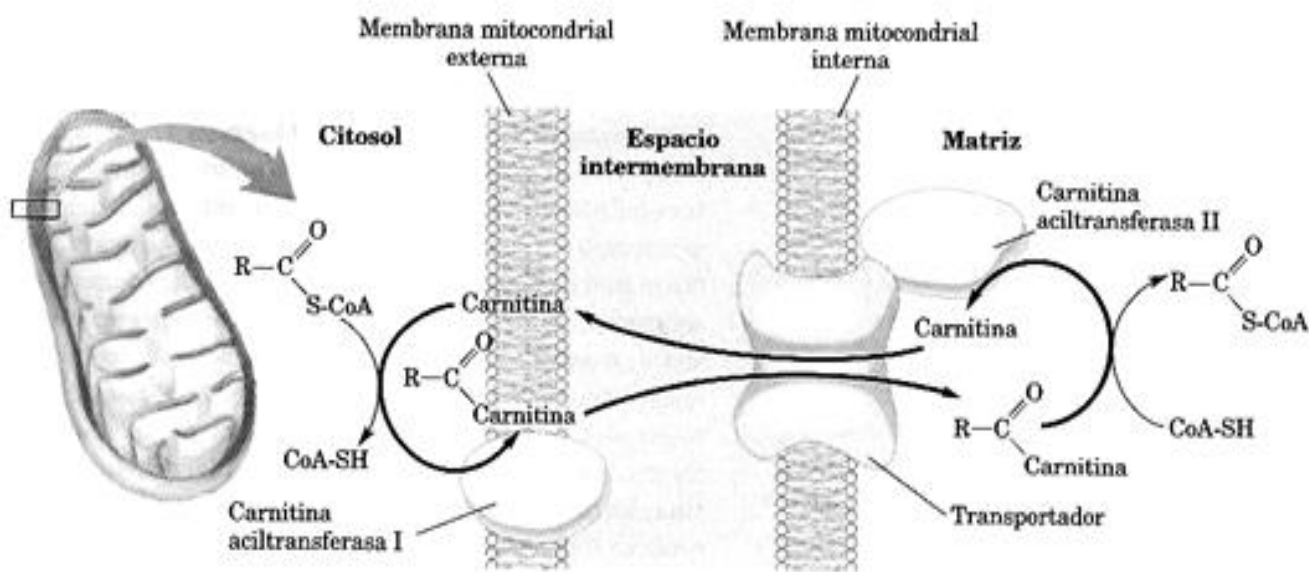
La enzima *Acil CoA sintetasa* se encuentra en el citosol y la oxidación se realiza en el interior de la matriz mitocondrial.

Los ácidos grasos de 12 o menos carbonos entran en la mitocondria sin la ayuda de transportadores de membrana. Los ácidos grasos de 14 o más carbonos, que constituyen la mayoría de los obtenidos en la dieta o liberados del tejido adiposo, no pueden pasar directamente a través de las membranas mitocondriales. Por consiguiente debe existir un sistema de transporte que permita transferir el grupo acilo hacia la matriz mitocondrial, que es impermeable a los ácidos grasos y a sus derivados CoA. Este sistema es el de la **Lanzadera de la carnitina**. El sistema de transferencia comprende dos enzimas la *carnitina-acil transferasa I*, ubicada en la cara externa de la membrana interna de la mitocondria y la *carnitina acil transferasa II*, colocada en la faz de la membrana que da a la matriz.

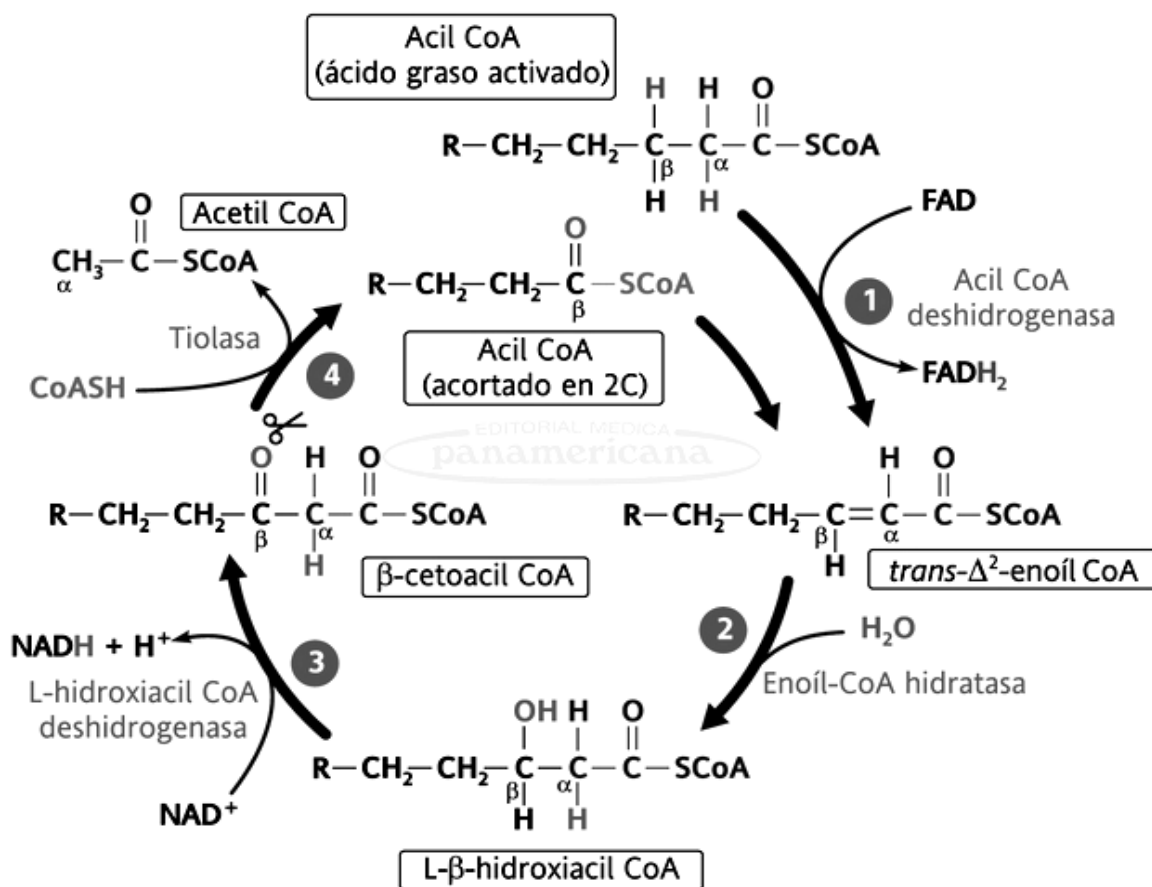
La molécula transportadora es la **carnitina**:



Mediante la siguiente representación podemos esquematizar dicho sistema de transporte:



OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS



Extraído de "BIOQUÍMICA. Conceptos esenciales." Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. Editorial Panamericana.

1° Ed. 2010

Balance energético de la oxidación total del Ácido Palmítico (16 C)

Producción de ATP en la beta-oxidación. Siete ciclos (5x7).....+ 35

Producción de ATP por oxidación en el ciclo de Krebs (8 acetilCoA) (12x8).....+ 96

Consumo para activación inicial.....- 2

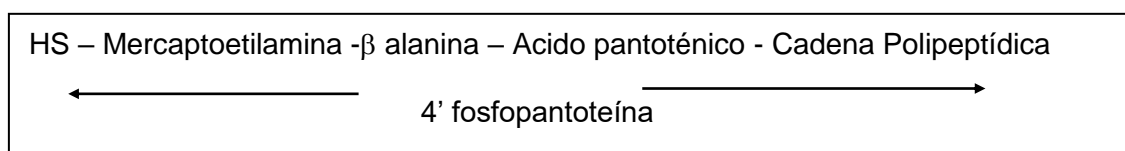
Total.....129

Un mol de ácido palmítico genera 129 moles de ATP. El 40% de la energía libre standard de la oxidación de palmítico se recupera en forma de fosfato de alta energía.

BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS

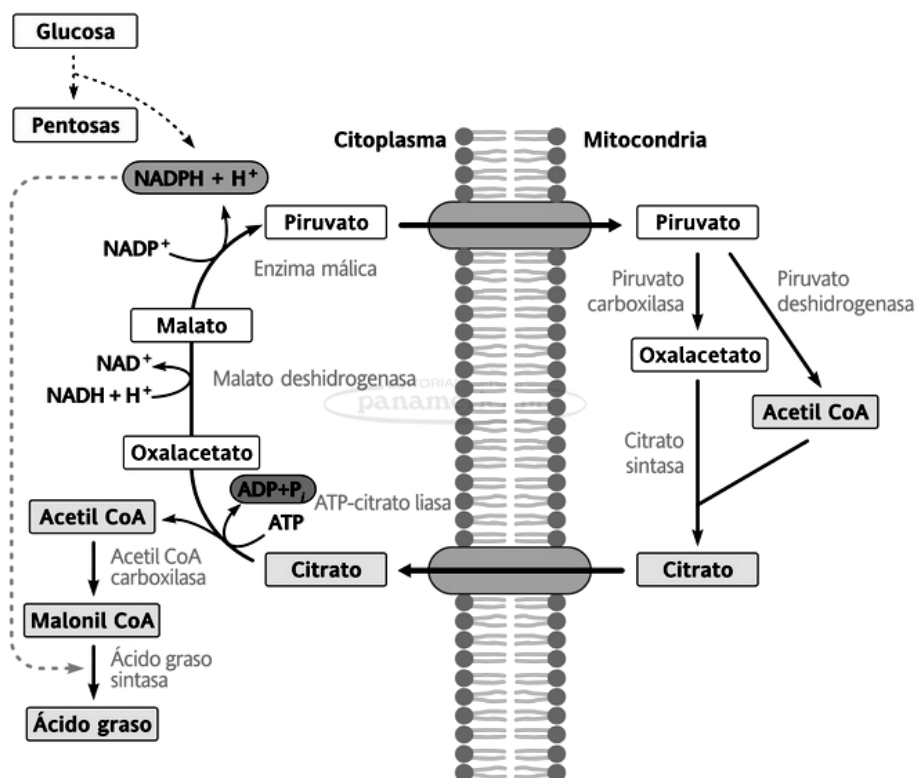
La síntesis completa de ácidos grasos saturados a partir de acetato activo (Acetil-CoA), ocurre en el **citósol**, en órganos como hígado, glándulas mamarias durante la lactancia, tejido adiposo, riñón y pulmón. Como en el caso del metabolismo del glucógeno que comienza y termina con glucosa-1-fosfato; la biosíntesis y degradación de los ácidos grasos también comienza y termina con el mismo compuesto: acetil CoA.

El principal producto formado es el palmitato libre, y es sintetizado por un **complejo multienzimático citosólico** llamado **ácido graso sintasa**, el sistema está formado por dos subunidades idénticas que funcionan en estrecha asociación. Cada subunidad presenta siete sitios catalíticos y la proteína portadora de restos acilo, denominada PTA ó ACP (acyl carrier protein). La ACP es una proteína termoestable, posee un grupo prostético: 4' fosfopantoteína fijado a un residuo de serina de la cadena polipeptídica. Al igual que la Coenzima A, la ACP tiene también un grupo mercaptoetilamina.



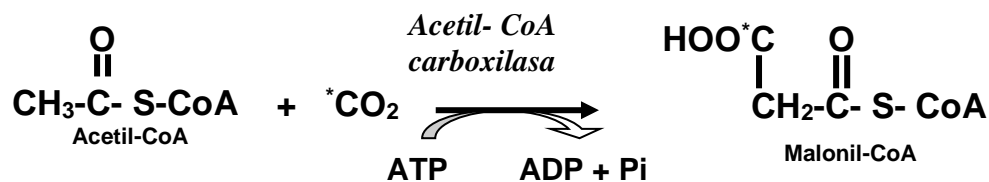
En bacterias (*E. coli*) las enzimas del complejo están asociados alrededor de una molécula central de ACP y se pueden separar en las diferentes enzimas conservando su actividad. El grupo acilo en crecimiento es transportado de enzima en enzima, como en un montaje en serie fijado al ACP tioéster.

Dado que los ácidos grasos se sintetizan en el citósol a partir de acetil-CoA y que estos restos de dos carbonos se producen en la matriz mitocondrial, es necesario que los acetatos activos sean transferidos al exterior de las mitocondrias. La membrana interna no es permeable a acetil CoA y el sistema transportador de la carnitina funciona preferentemente con acilos de cadena larga. Las moléculas de Acetil-CoA reaccionan con oxalacetato formando citrato, de esta manera abandonan la mitocondria y son liberados para la síntesis de ácidos grasos, el citrato es escindido en reacción catalizada por **Citrato liasa** citosólica, con la participación de coenzima A y ATP. El oxalacetato se reduce a malato que vuelve a la matriz mitocondrial.

Ciclo del citrato. Origen del citrato y actuación de la *acetil-CoA carboxilasa*

Formación de Malonil-CoA

Acetil CoA reacciona con CO_2 para formar malonil-CoA por acción de acetil-CoA carboxilasa que utiliza biotina (Vitamina del complejo B) como coenzima que actúa como verdadero transportador de CO_2 .



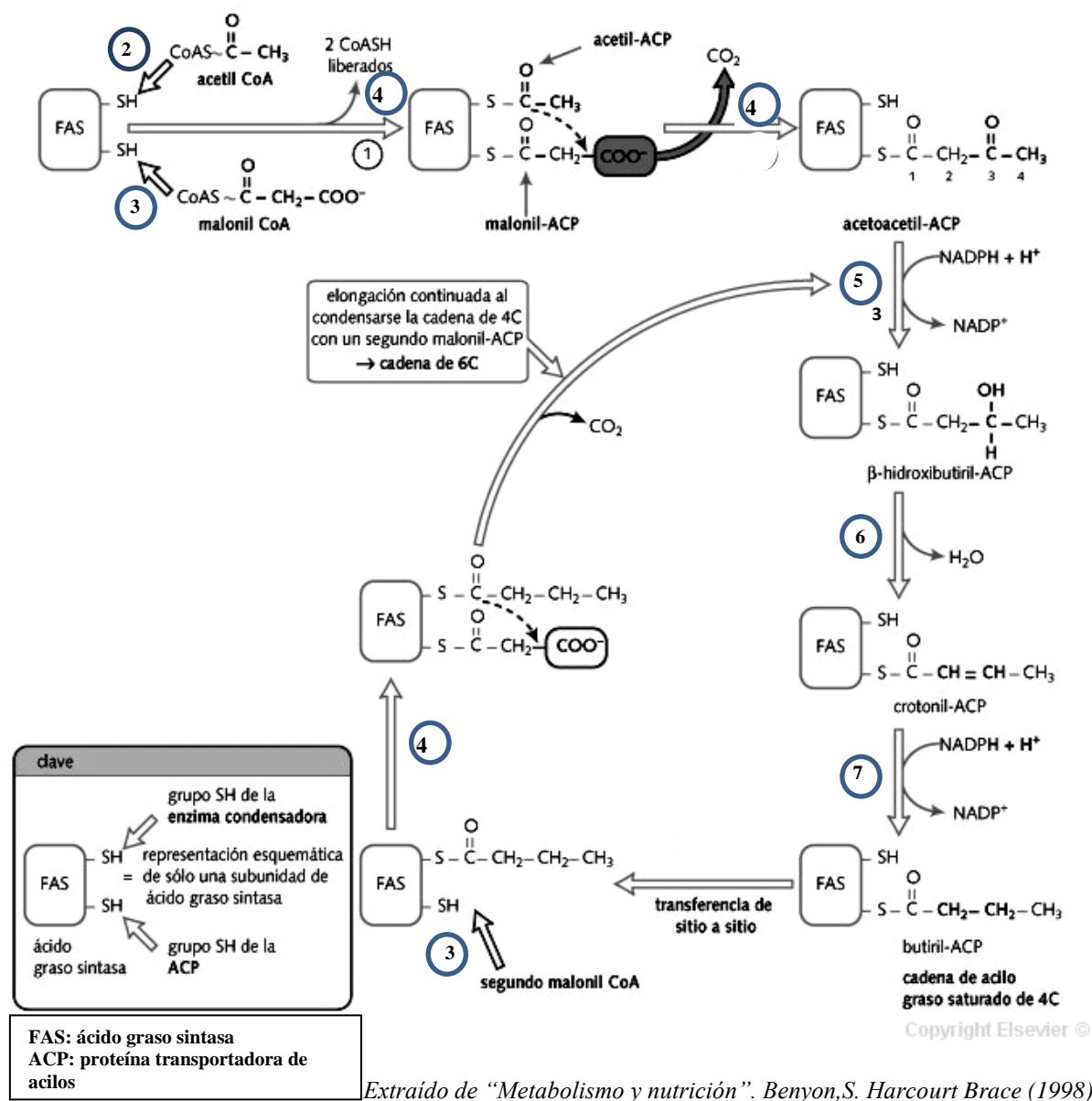
Esta etapa es **irreversible** y es **limitante** de la velocidad en la biosíntesis de ácidos grasos. La enzima *Acetil CoA carboxilasa* es alostérica, estimulada por citrato e inhibida por ácidos grasos libres y por acil-CoA de cadena larga como palmitil-CoA. Su actividad está también regulada por hormonas y la dieta.

Reacciones de Síntesis de Ácidos Grasos

A continuación se enumeran las reacciones que conducen a la síntesis de palmitato en los organismos superiores y bacterias.

Etapas	Reacción	Enzima
1	Acetil-CoA + HCO_3^- + ATP \longrightarrow Malonil-CoA + ADP + Pi + H^+ Acetil-CoA carboxilasa	
2	Acetil-CoA + HS-EC \longrightarrow Acetil-EC + CoA	Acetil transferasa
3	Malonil-CoA + ACP \longrightarrow Malonil-ACP + CoA transferasa	Malonil
4	Acetil-EC + Malonil-ACP \longrightarrow Acetoacetyl-ACP + HS-EC + CO_2 Enzima condensante	
5	Acetoacetyl-ACP + NADPH + H^+ \longrightarrow D-3-OH-butil-ACP + NADP $^+$ reductasa	β -Cetoacil-
6	D-3-OH-butil-ACP \longrightarrow Δ^2 butenoil-ACP + H_2O deshidratasa	3-OH-acil
7	Δ^2 butenoil-ACP + NADPH + H^+ \longrightarrow Butiril-ACP + NADP $^+$ reductasa	Enoil-ACP

A continuación se presentan esquemas de las reacciones: 4, 5, 6 y 7.



El producto de esta secuencia de reacciones es butiril-ACP, lo cual completa el primer ciclo de elongación. En el segundo ciclo el Butiril es transferido desde la ACP a la enzima condensante (EC) formándose Butiril-EC, éste se condensa con otra molécula de malonil-ACP y se repite el ciclo para formar un hexil-ACP. Los ciclos de elongación continúan hasta llegar a palmitil-ACP, el cual se hidroliza por una *esterasa* para producir palmitato y ACP. Para la síntesis de ácido Palmítico se gastan 7 moléculas de ATP y 14 NADPH.

Comparación de la Síntesis y Degradación de los ácidos grasos

	Síntesis	Degradación
Activa	Tras comidas, situación post-prandial	Ayuno y ejercicio prolongado
Principales tejidos implicados	Hígado y tejido adiposo	Músculo e hígado
Zona	Citosol	Mitocondria
Donante/ productor de 2C	Acetil-CoA/ Malonil-CoA	Acetil-CoA
Transportador de Ácido Graso activo	Unido a ACP	Unido a CoA
Enzimas	complejo multienzimático: <i>Ácido Graso Sintasa</i>	Probablemente no asociadas.
Oxidante / reductor	NADPH	NAD ⁺ y FAD
Control alostérico	El citrato activa la acetil-CoA carboxilasa, el palmitil-CoA la inhibe.	Malonil-CoA inhibe la carnitina-acil-transferasa
Control hormonal	La insulina activa la acetil-CoA carboxilasa, la adrenalina y el glucagón la inhiben.	La adrenalina y el glucagón activan la lipasa, la insulina la inhibe
Producto	Palmitato.	Acetil CoA

PROBLEMAS DE APLICACIÓN**DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**

1- Se oxida palmitato ($9-^{14}\text{C}$) en condiciones de funcionamiento del Ciclo de Ácido Cítrico. ¿Cuál será la localización del ^{14}C en los siguientes compuestos?

- a) Acetil-CoA.
- b) Citrato. Considérese tan solo una vuelta al Ciclo de Krebs.
- c) Butiril-CoA.

2- a- ¿Cuántas veces se debe repetir la secuencia de oxidación de Ácidos Grasos para oxidar el Ácido esteárico (18 C) completamente hasta Acetil-CoA y cuántos ATP se generan teniendo la activación?

b- Calcule el rendimiento de ATP para el mismo ácido cuando es oxidado completamente hasta CO_2 y H_2O . ¿qué ocurriría con la cantidad de ATP generado suponiendo que exista un déficit de oxalacetato?

3- Si el ácido palmítico marcado en posición de C_{15} y C_{16} se degradara a Acetil-CoA por beta oxidación. ¿Estaría marcada la unidad de Acetil-CoA producida a partir de la ruptura tiolítica del beta-cetopalmitil-CoA o a partir de la ruptura tiolítica de acetoacetil-CoA?

4- Demostrar que el rendimiento de ATP por la oxidación de un ácido graso de 6 carbonos es mayor que el de una hexosa. Considerar que el catabolismo procede hasta CO_2 y H_2O .

BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

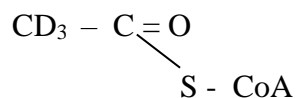
5- Suponiendo que se incubara homogenato de tejido que posee todas las enzimas necesarias para la síntesis de ácidos grasos y también NADPH, ATP, CO_3H^- y $2-^{14}\text{C}$ -piruvato ¿Cuáles serán los átomos de carbono que resultarán marcados en el ácido palmítico?

6- Si sólo se marcara con ^{14}C la primera de las ocho moléculas de Acetil-CoA que se requieren en la biosíntesis del ácido palmítico, ¿dónde se localizaría la marca en el ácido palmítico?

7- Cuántas moléculas de glucosa se convierten en ribulosa-5-P cuando una molécula de ácido palmítico se sintetiza a partir de acetil-CoA? Considere que los carbonos del oxalacetato producido por el clivaje del citrato, regresan a la mitocondria a través de malato y no por el piruvato que podría obtenerse por acción de la enzima málica.

8- Considérese una preparación que contiene todas las enzimas y los cofactores necesarios para la biosíntesis de los ácidos grasos a partir de acetil CoA y malonil CoA que se han añadido.

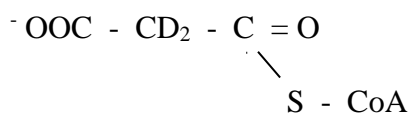
- a)** Si la acetil CoA marcada con deuterio (isótopo pesado del hidrógeno) y un exceso de malonil CoA se añaden como sustrato.



¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?

¿Cuáles son sus localizaciones? Explicar.

- b)** Si se añaden como sustratos acetil CoA sin marcar y malonil CoA marcada con deuterio



¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?

¿Cuáles serán sus localizaciones? Explicar.

GUÍA DE ESTUDIO**DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**

- Formular la primera secuencia de reacciones de la degradación de palmitil-CoA, mencionando las enzimas que intervienen.
- ¿Qué enzima interviene en el proceso de activación de un ácido graso? Formular la reacción.
- ¿Cuántas uniones de alta energía se gastan?
- ¿Cómo se transporta el ácido graso desde el citosol a la mitocondria?
- ¿Cuáles son las coenzimas que intervienen en el proceso de $\square\square$ oxidación?
- ¿En qué lugar de la célula ocurre el proceso de degradación de los ácidos grasos?
- ¿Cuáles son los productos de la degradación de un ácido graso de número impar de átomos de carbono?
- ¿Cuántos ATP y cuántas moléculas de Acetil-CoA se producen por degradación de un ácido graso de 12 átomos de carbono hasta acetil-CoA?
- Idem hasta CO_2 y H_2O ?
- ¿En qué procesos metabólicos pueden utilizarse los carbonos provenientes de la degradación de los ácidos grasos?

BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

- Formular las etapas de la síntesis de ácidos grasos indicando las enzimas correspondientes.
- ¿Cuál es el intermediario del Ciclo de Krebs que transporta los grupos acetatos desde la mitocondria al citosol?
- ¿Cuál es la etapa limitante de la velocidad de reacción y cuáles son los moduladores de la enzima?
- ¿Cuáles son los precursores de la síntesis de ácidos grasos?
- ¿Cuántas moléculas de NADPH y ATP se requieren para sintetizar palmitoil-ACP?
- ¿De dónde proviene el NADPH?

TRABAJO PRÁCTICO N° 6

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y NUCLEÓTIDOS

OBJETIVOS

Que el alumno logre:

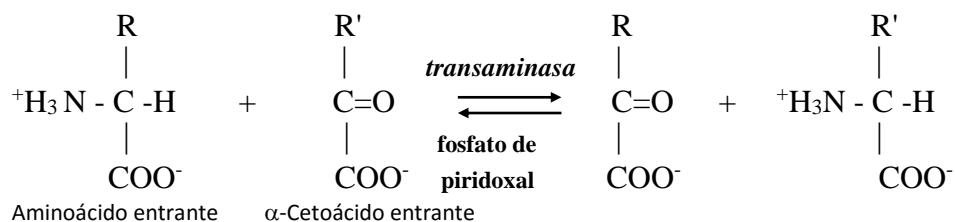
- Conocer los mecanismos de degradación de aminoácidos: transaminación, desaminación oxidativa, destino del grupo amino y de los esqueletos carbonados.
- Comprender la vía de eliminación del amoníaco a través del ciclo de la urea, las reacciones y enzimas involucradas, regulación, origen de los precursores, localización intracelular, balance energético.
- Formular las vías de síntesis de nucleótidos púricos y pirimídicos.
- Describir los mecanismos de regulación, requerimientos energéticos, vías de recuperación.
- Comprender los mecanismos de degradación de nucleótidos púricos y pirimídicos, enzimas, regulación, productos de degradación, importancia clínica.

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

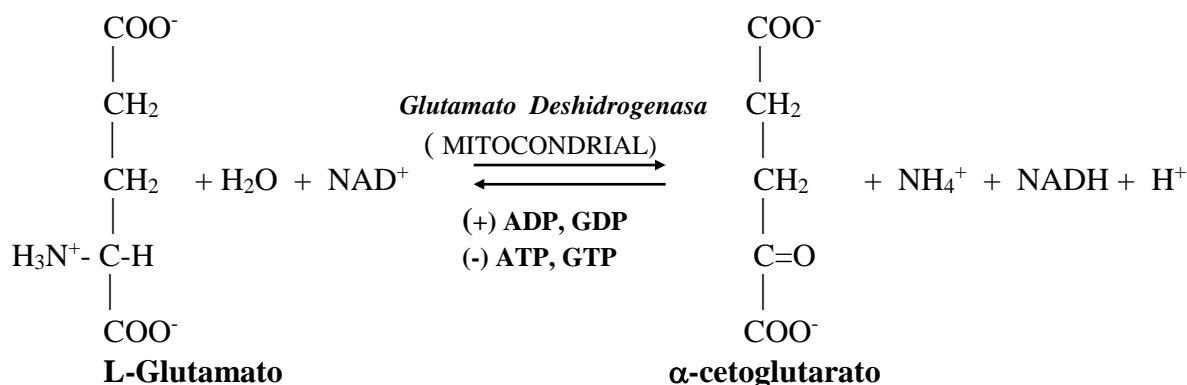
Los aminoácidos experimentan la pérdida de sus grupos amino por dos rutas principales: transaminación y desaminación oxidativa. Sus esqueletos carbonados residuales pueden convertirse en glucosa u oxidarse a CO₂ a través del Ciclo de Krebs.

Transaminación

La ecuación general puede representarse así:

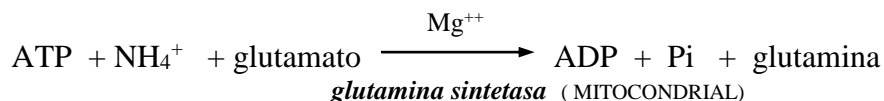


Desaminación oxidativa

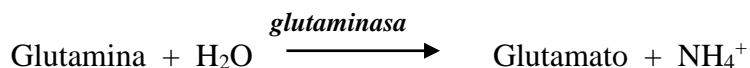


La *glutamato deshidrogenasa* es una enzima alostérica, es activada por ADP y GDP e inhibida por ATP y GTP.

En la mayoría de los vertebrados terrestres el NH_4^+ se convierte en urea, que es excretada. El amoníaco es transportado desde los tejidos periféricos al hígado o los riñones en forma de un compuesto no tóxico, glutamina. La síntesis de glutamina tiene lugar por acción de la enzima *glutamina sintetasa* que promueve la siguiente reacción:

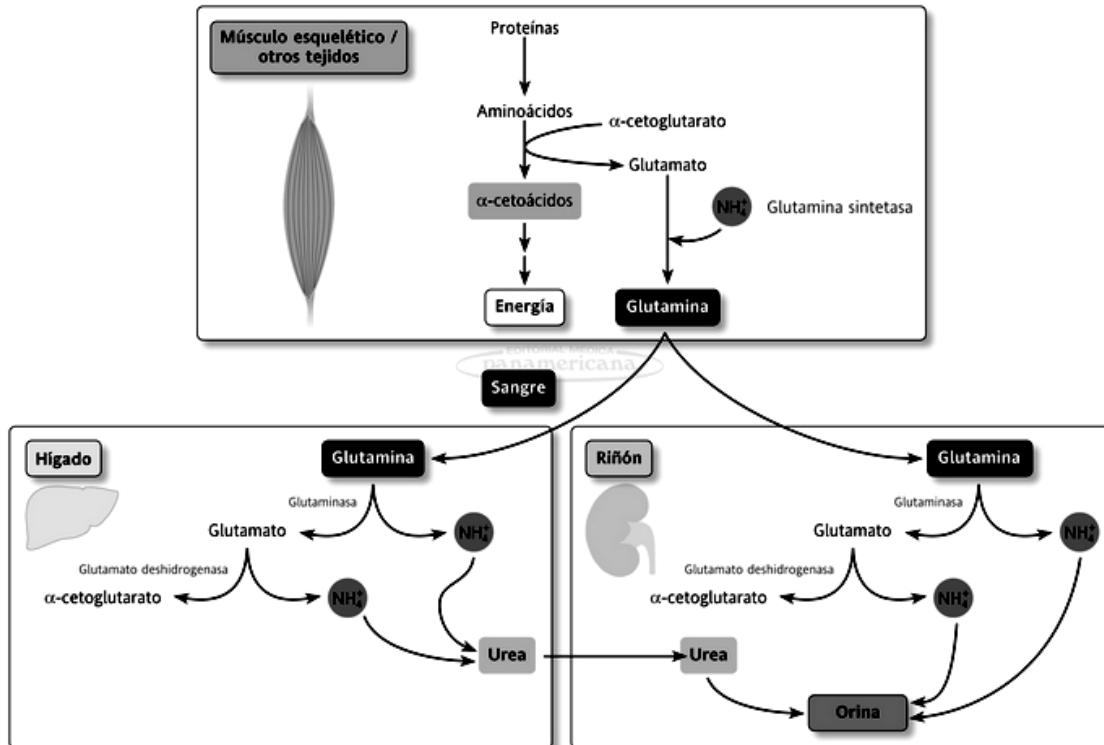


En la mayor parte de los animales, la glutamina es transportada por vía sanguínea hasta el hígado, en donde se transforma en glutamato y amoníaco por acción de la *glutaminasa*. Esta enzima también se encuentra en los túbulos renales.



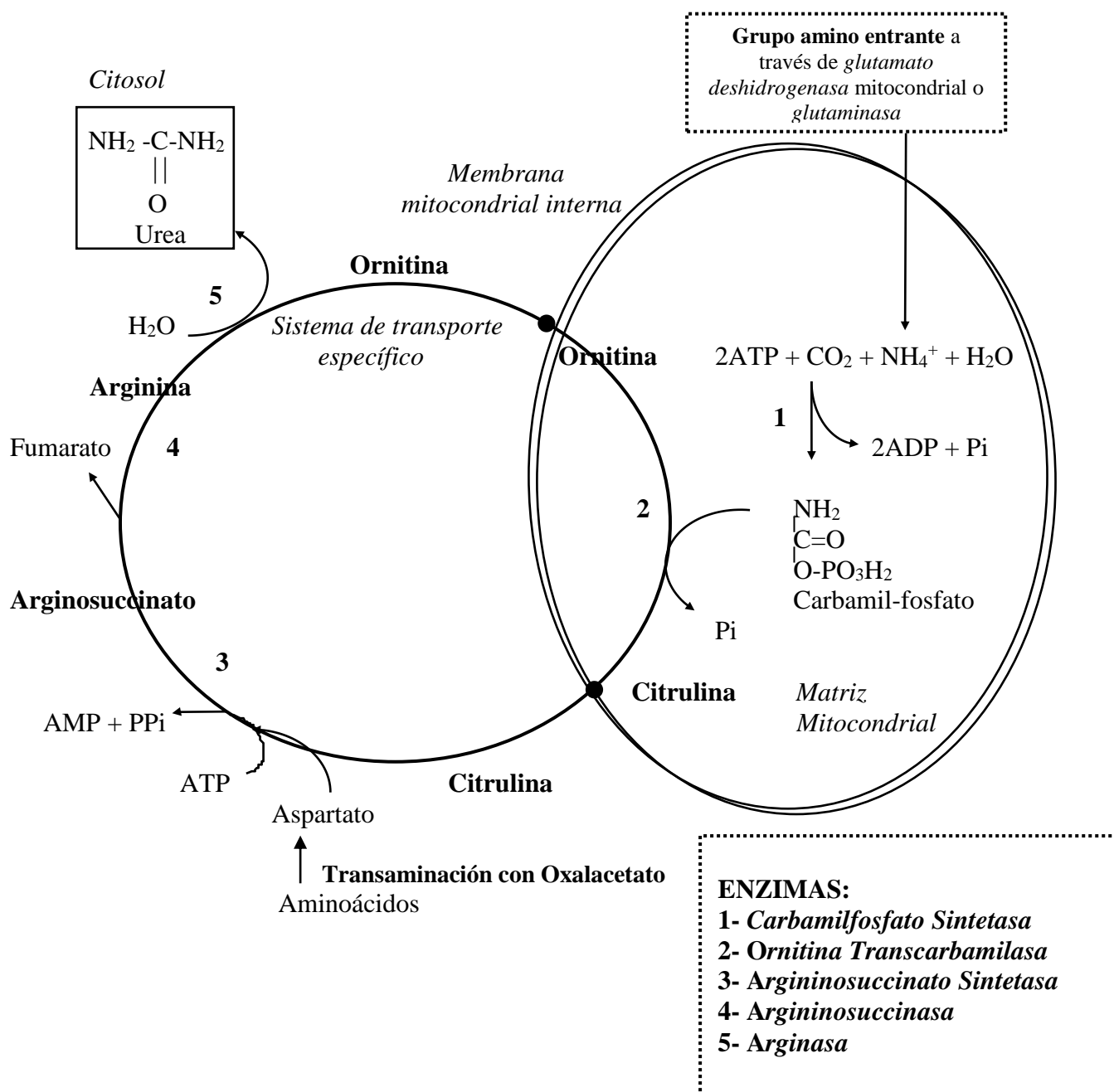
El amoníaco así formado se convierte en urea en el hígado.

Transporte de Nitrógeno al hígado y al riñón



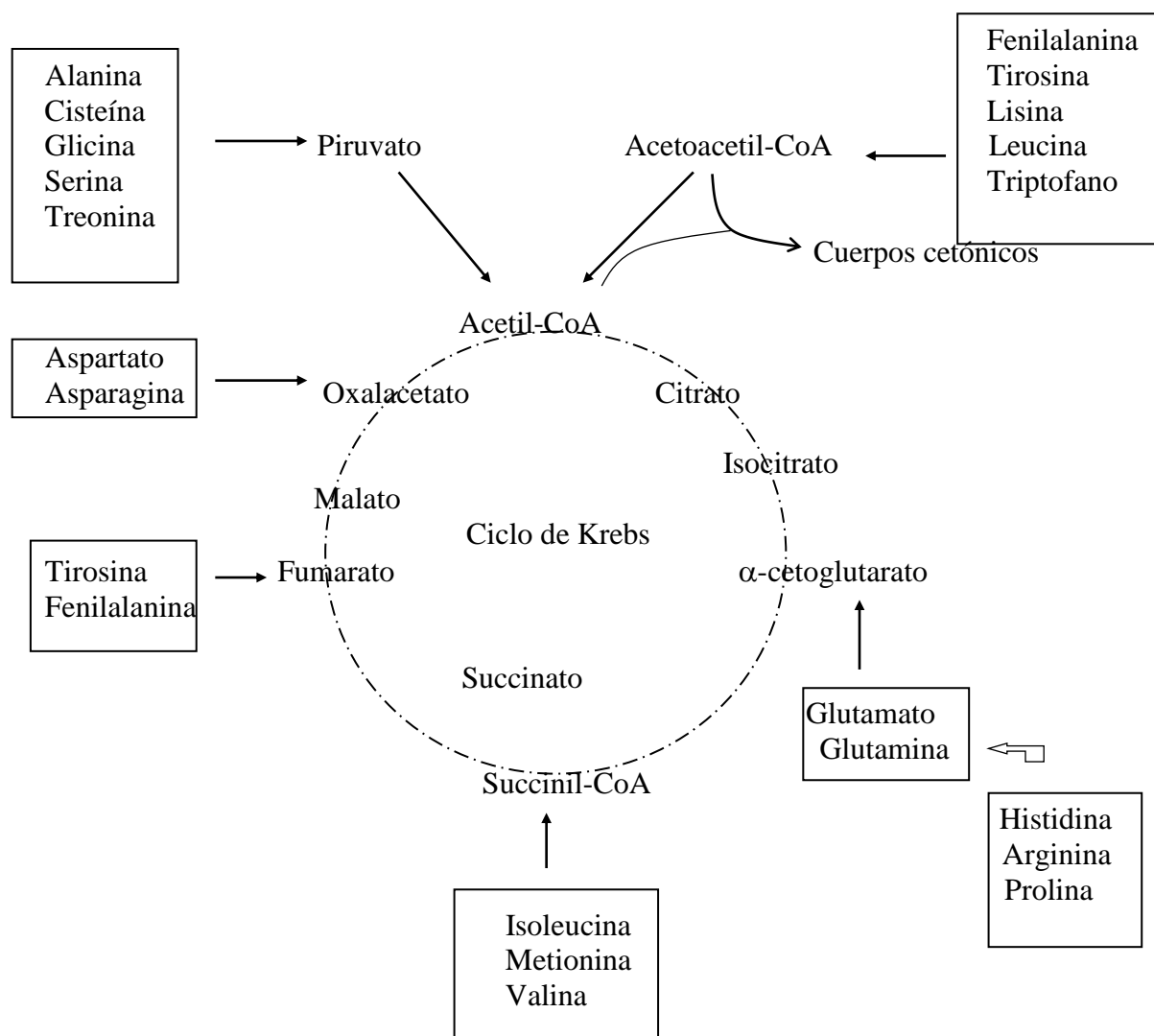
CICLO DE LA UREA

Los átomos de nitrógeno de los grupos alfa amino, separados de los aminoácidos durante su degradación oxidativa, son excretados por orina en forma de urea, amoníaco o ácido úrico, según la especie. La formación de urea tiene lugar en el **hígado** y es catalizada por una secuencia de reacciones enzimáticas que se denomina Ciclo de la Urea. Utiliza CO_2 y amoníaco que proviene de las reacciones de la enzima glutaminasa o de desaminación oxidativa, incorporándose luego otro resto amino proveniente del aspartato. La urea es transportada por sangre a los riñones y se elimina por orina.



DESTINO DEL ESQUELETO CARBONADO DE LOS AMINOÁCIDOS

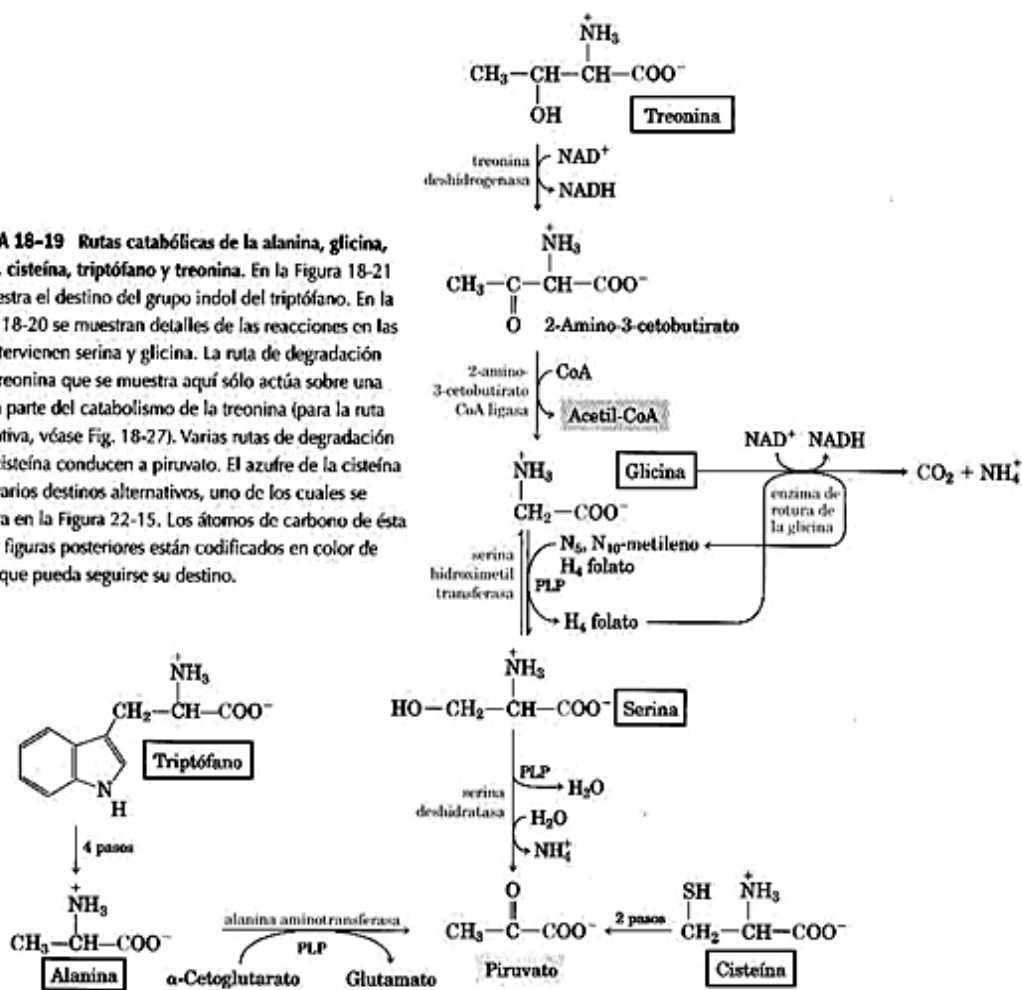
Para la degradación, existen secuencias de reacciones que convergen finalmente en unas pocas rutas terminales que conducen a piruvato, a acetil-CoA o a intermediarios del Ciclo de Krebs, como lo muestra el esquema siguiente:



La ruta del fumarato es seguida por algunos de los átomos de carbono de la tirosina y la fenilalanina.

Degradación de aminoácidos a piruvato

FIGURA 18-19 Rutas catabólicas de la alanina, glicina, serina, cisteína, triptófano y treonina. En la Figura 18-21 se muestra el destino del grupo indol del triptófano. En la Figura 18-20 se muestran detalles de las reacciones en las que intervienen serina y glicina. La ruta de degradación de la treonina que se muestra aquí sólo actúa sobre una tercera parte del catabolismo de la treonina (para la ruta alternativa, véase Fig. 18-27). Varias rutas de degradación de la cisteína conducen a piruvato. El azufre de la cisteína tiene varios destinos alternativos, uno de los cuales se muestra en la Figura 22-15. Los átomos de carbono de ésta y otras figuras posteriores están codificados en color de forma que pueda seguirse su destino.



Extraído de: LEHNINGER, A.L., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4ª ed. (2008).

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1- Nombrar los α -cetoácidos que se forman por transaminación de los siguientes aminoácidos:

- a) Alanina
- b) Aspartato
- c) Glutamato
- d) Fenilalanina
- e) Tirosina

2- El fosfato de piridoxal es necesario como cofactor en las siguientes reacciones de algunos aminoácidos:

- a) **Desaminación.** b) **Descarboxilación.** c) **Transaminación.**

Ejemplifique con los aminoácidos tirosina, serina y alanina, formulando las reacciones correspondientes.

3- Los tres carbonos del lactato y de la alanina poseen estados de oxidación idénticos y los animales pueden emplear cualquiera de ellos como fuente carbonada para combustible metabólico. Compárese el rendimiento neto en ATP (moles de ATP por mol de sustrato) para la oxidación completa a CO_2 y H_2O , del lactato frente a alanina cuando se incluye la excreción de nitrógeno en forma de urea.

4- Dos grupos de ratas fueron alimentadas con ^{15}N -aspartato. Un grupo fue también alimentado con fluoracetato (el cual es convertido en fluorocitrato, que es un inhibidor de la aconitasa). Después de tres días, los animales fueron sacrificados, las proteínas hepáticas hidrolizadas, y el glutamato se determinó por la presencia del ^{15}N . Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Grupo con ^{15}N -aspartato	Grupo con ^{15}N -aspartato y fluoracetato
Glutamato aislado % de ^{15}N	0,65	0,12

. Explicar la disminución de la incorporación de ^{15}N en el glutamato del segundo grupo.

GUIA DE ESTUDIO**Degradación de aminoácidos**

- ¿Cómo se sintetiza glutamina? Formule la reacción completa.
- ¿Mediante qué reacciones la glutamina se transforma en un intermediario del C.de Krebs?
- ¿Cuáles son los inhibidores y activadores alostéricos de la enzima glutamato deshidrogenasa? ¿En qué lugar de la célula se encuentra esta enzima?
- Formule las reacciones de transaminación de GOT Y GPT.
- ¿Cuál es el cofactor que utilizan las transaminasas y cómo actúa ?
- ¿En qué vías metabólicas pueden utilizarse los productos de degradación de los aminoácidos?
- ¿Qué intermediarios del ciclo de Krebs se forman por degradación de cada uno de los aminoácidos?
- ¿Cuáles son los aminoácidos glucogénicos y cetogénicos?

Ciclo de la urea

- ¿En qué órganos se lleva a cabo el ciclo de la urea?
- ¿En qué lugar de la célula ocurren las diferentes reacciones del ciclo y qué funciones cumple?
- ¿De cuáles aminoácidos provienen los nitrógenos de la urea?
- ¿De qué reacción proviene el primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea en forma de amoníaco libre?
- ¿Cuáles son las reacciones que consumen energía y cuántos enlaces rico en energía se gastan en cada una de ellas?
- ¿Qué productos de desecho se eliminan por el ciclo de la urea?

METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS

INTRODUCCIÓN

La biosíntesis de los **desoxirribonucleótidos** y de los **ribonucleótidos**, constituye un proceso fundamental en todas las células, puesto que los nucleótidos son los precursores directos del DNA y del RNA, y además muchos participan en el metabolismo como coenzimas. Un aspecto importante de la biosíntesis de los nucleótidos lo constituye la ruta de formación de sus bases: las **pirimidinas** y las **purinas**.

Tanto los nucleótidos como sus bases nitrogenadas se emplean con economía, en la mayoría de los organismos no se utilizan como fuente de energía. Los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos son sintetizados a partir de compuestos sencillos y en la mayor parte de los organismos siguen la misma vía (solamente algunas bacterias requieren bases púricas o pirimidínicas preformadas). Estas vías de biosíntesis de los nucleótidos están sometidas a estrictos mecanismos de control a través de enzimas alostéricas. Dado que los cuatro desoxirribonucleótidos principales y los cuatro ribonucleótidos fundamentales se hallan insertados en el DNA y en el RNA de las células según relaciones molares específicas, dichos mecanismos reguladores se adecuan para lograr una proporción de nucleótidos conveniente para cada tipo de ácido nucleico y para cada tipo de célula.

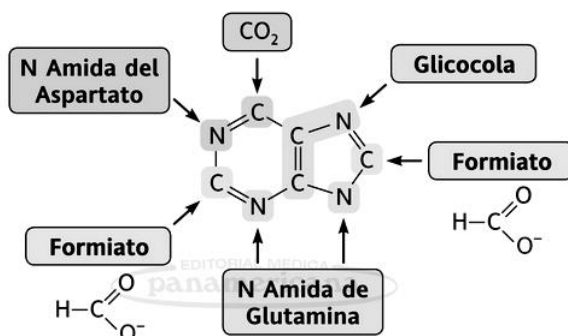
Tanto el DNA como el RNA son polinucleótidos, cada nucleótido está constituido por una base nitrogenada, un grupo fosfato y una pentosa.

En el **DNA** la pentosa es la **2-D-desoxirribosa**, las bases nitrogenadas derivadas de purina son **Adenina** y **Guanina** y las derivadas de pirimidina son **Timina** y **Citosina**.

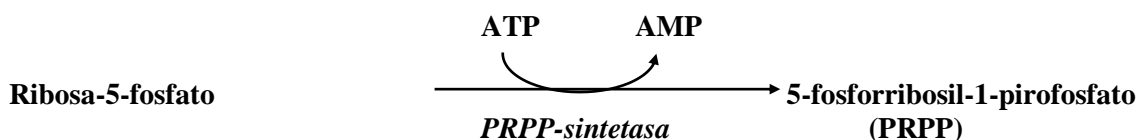
En el **RNA** la pentosa es la **D-ribosa**, las bases nitrogenadas derivadas de purina son **Adenina** y **Guanina** y las derivadas de pirimidina son **Uracilo** y **Citosina**.

BIOSÍNTESIS DE RIBONUCLEÓTIDOS PÚRICOS

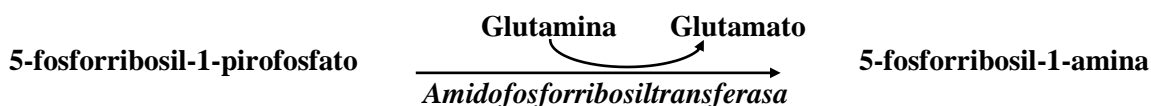
El anillo de purina se sintetiza en las células a partir de moléculas o restos moleculares pequeños. Se ha podido determinar el origen de cada uno de los carbonos y nitrógenos del núcleo de purina:



La biosíntesis de los ribonucleótidos púricos comienza con **ribosa-5-fosfato** y sobre ella se construye el anillo de purina en etapas sucesivas. La síntesis de novo de bases púricas y pirimidínicas como así también las vías de recuperación utilizan un precursor común: el fosforribosil pirofosfato (PRPP) el cual se sintetiza a partir de ribosa-5-fosfato (proviene de la Vía de las Pentosas) y ATP por acción de la enzima *pirofosfoquinasa* o *fosforribosil pirofosfato sintetasa*. La enzima activa el carbono 1 de ribosa-5-fosfato transfiriendo el pirofosfato desde el ATP.

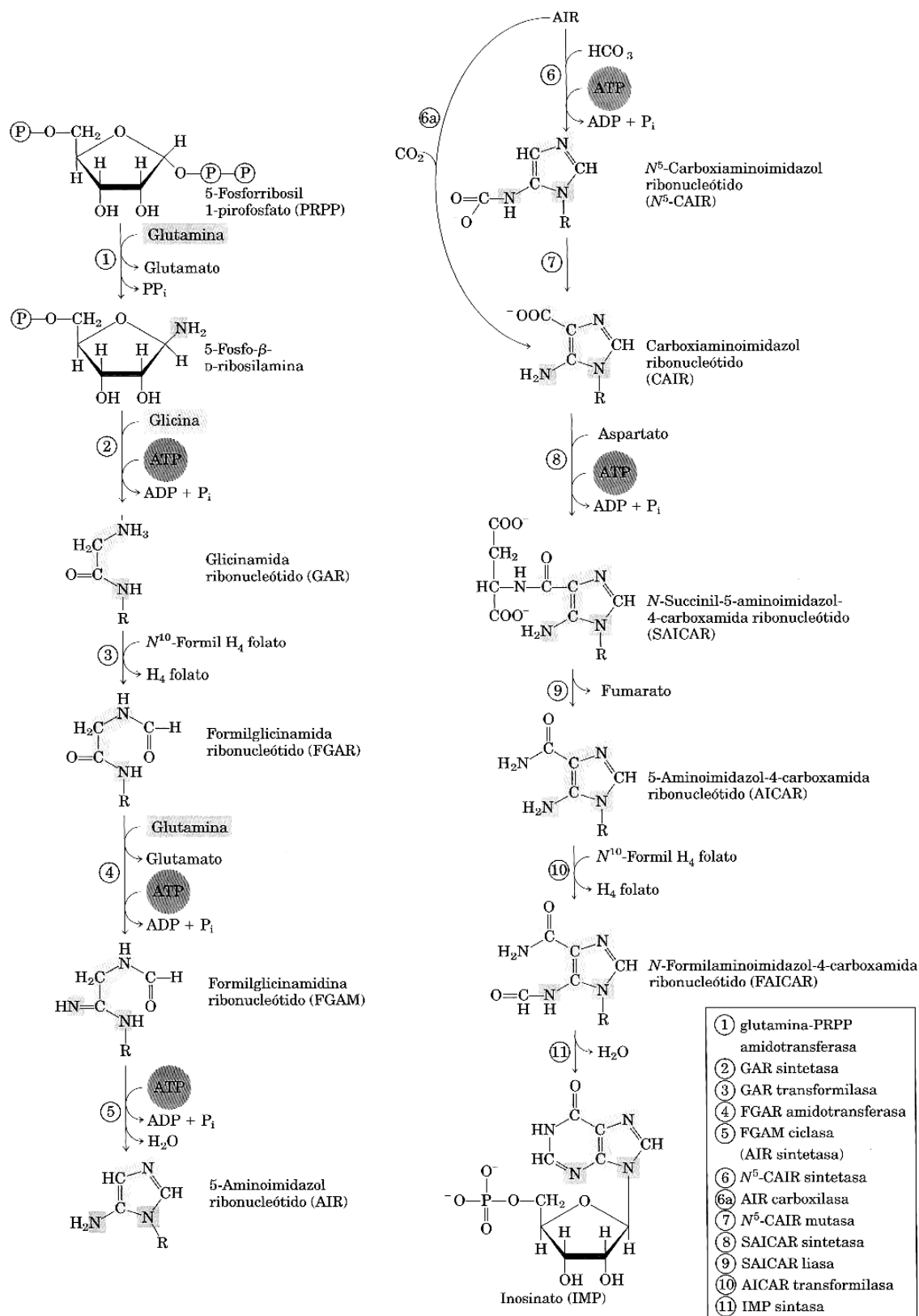


En el paso siguiente, la glutamina proporciona un grupo amino que se une al C1 del PRPP liberando pirofosfato y constituyendo la 5-fosforribosilamina. Esta reacción es catalizada por la enzima *amidofosforribosil transferasa* o *glutamina-PRPP amidotransferasa*

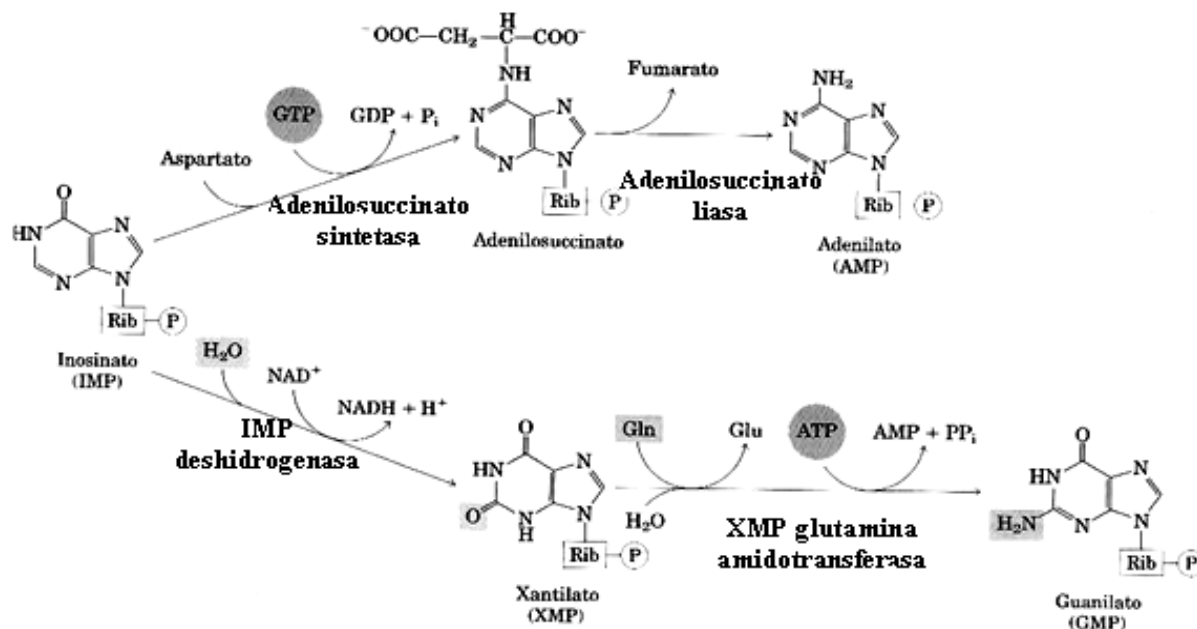


En las siguientes etapas intervienen sucesivamente aminoácidos, derivados de folato y CO_3H^- . Estos se ensamblan a través de numerosas reacciones al PRPP. Al final de este proceso de síntesis el producto formado es Inosina Monofosfato (IMP) o Ácido Inosínico, a partir de la cual tiene lugar la vía de bifurcación que conduce a la biosíntesis de Guanosina Monofosfato o Ácido Guanosínico (GMP) y de Adenosin Monofosfato o Ácido Adenílico (AMP)

Como la biosíntesis de los ribonucleótidos púricos comienza con la pentosa-P y sobre ella se construye el anillo de purina en etapas sucesivas, al final se obtiene un **nucleótido** y no una purina libre.



El AMP y el GMP (nucleótidos de purina) derivan del monofosfato de inosina (IMP) como se indica en el siguiente esquema:



Conversión de ácido inosínico en AMP y GMP

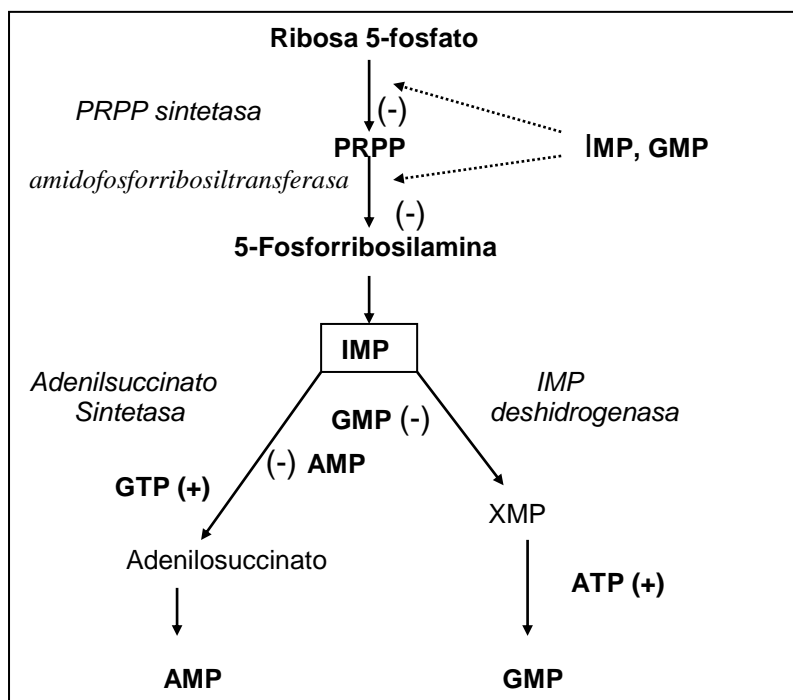
Regulación de Rutas Biosintéticas de Nucleótidos Purínicos

La síntesis de nucleótidos púricos es regulada por retroalimentación en varios niveles:

a) Formación de PRPP (*PRPP sintetasa*).

b) Etapa que va desde PRPP a fosforribosilamina (*amidofosforribosiltransferasa*), que es el principal sitio de control. Los nucleótidos AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, IDP e ITP actúan como inhibidores.

c) En la vía de bifurcación del IMP para la formación de ATP y GTP.



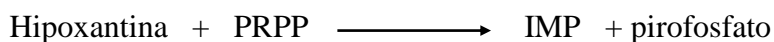
Por otro lado, el GTP es utilizado en la síntesis de AMP mientras que el ATP en la síntesis de GMP. Esto lleva que haya un equilibrio en la síntesis de los ribonucleótidos de adenina y guanina. Cuando se acumula **GTP activa** la enzima *adenilo succinato sintetasa* produciéndose mas ATP. Cuando se acumula **ATP** se **activa** la enzima *GMP-sintetasa* aumentando los niveles de GTP.

VÍA DE RECUPERACIÓN DE PURINAS

Las bases púricas libres, ya sea que procedan de la alimentación o del catabolismo de los ácidos nucleicos, pueden ser recicladas en AMP ó GMP. El mecanismo principal de recuperación reside en la reacción de la *adenina-fosforribosil-transferasa*:

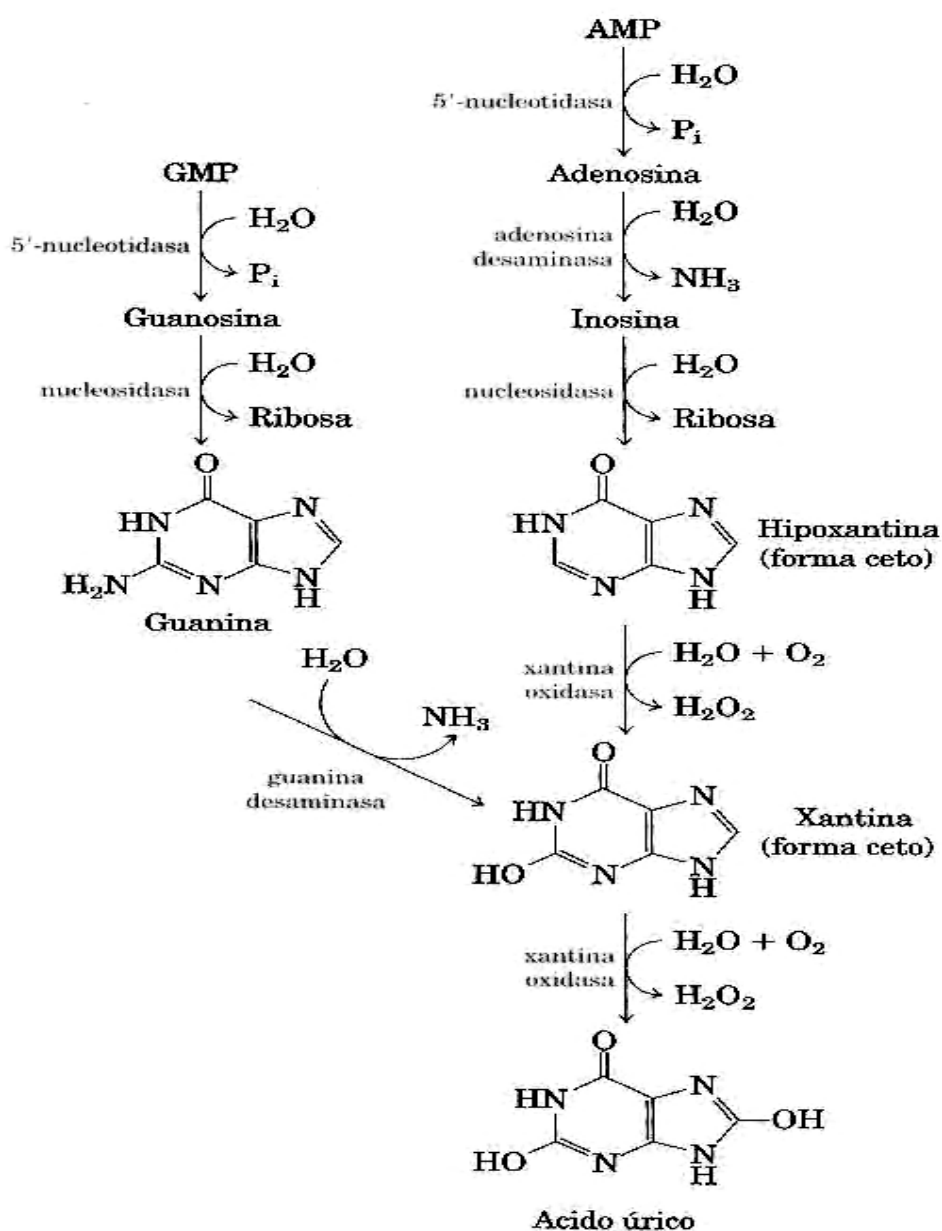


En una reacción semejante, la hipoxantina y la guanina son transformadas en los nucleótidos correspondientes por acción de la *hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa*.



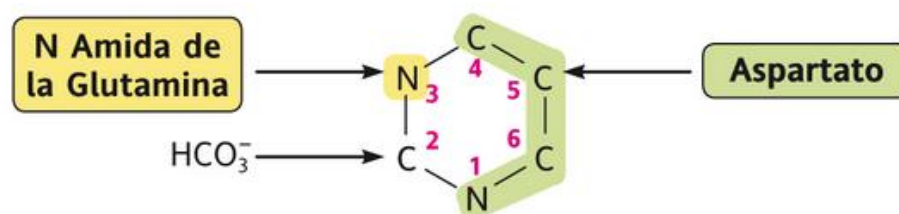
CATABOLISMO DE PURINAS

Si las bases libres no son recuperadas y reutilizadas, son degradadas y sus productos finales excretados La degradación de purinas a ácido úrico ha sido muy estudiada. Las principales purinas, adenina y guanina, se convierten en xantina, la cual es oxidada a ácido úrico por la acción de la enzima *xantina oxidasa*.

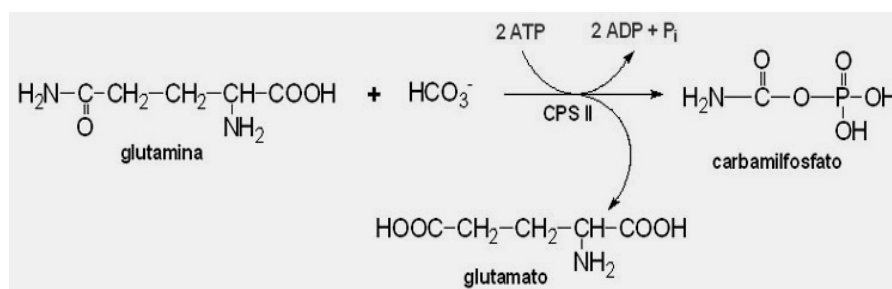


BIOSÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS PIRIMIDÍNICOS

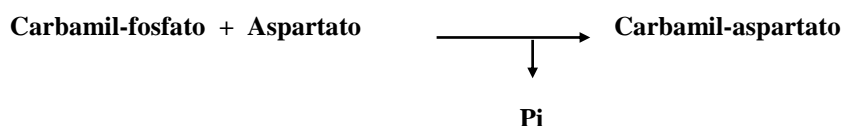
La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina transcurre de una manera algo diferente de la de los nucleótidos de purina. En este caso el anillo de pirimidina se sintetiza primero y luego se une al fosfato de ribosa. Se necesita carbamilsfato y aspartato como precursores. La contribución de ambos compuestos en la formación del anillo de pirimidina se puede representar así:



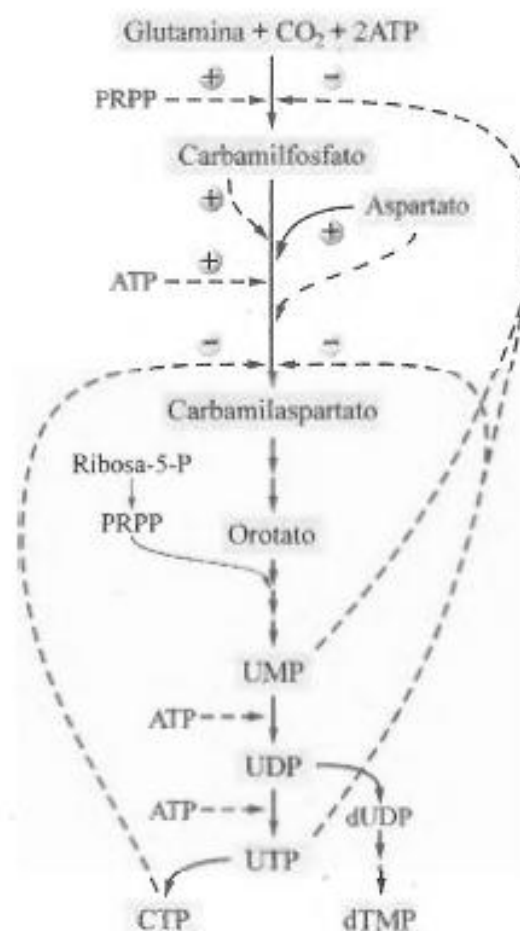
El primer paso de la síntesis es la formación del carbamilsfato. El grupo-amino procede de la deaminación de glutamina. La reacción catalizada por *carbamil fosfato sintetasa II* (CPS II) se puede representar:



Una vez formado el carbamil-fosfato, éste se combina con aspartato para formar carbamil-aspartato. La reacción es catalizada por la *aspartato transcarbamilasa*, enzima alostérica que constituye el principal sitio de regulación: CTP, producto final de la vía, actúa como un inhibidor de la misma.

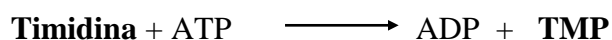
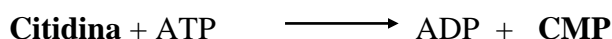


Después de tres pasos se obtiene el primer nucleótido de pirimidina (UMP) el cual se convierte posteriormente en UTP y CTP.



Recuperación de bases pirimidínicas

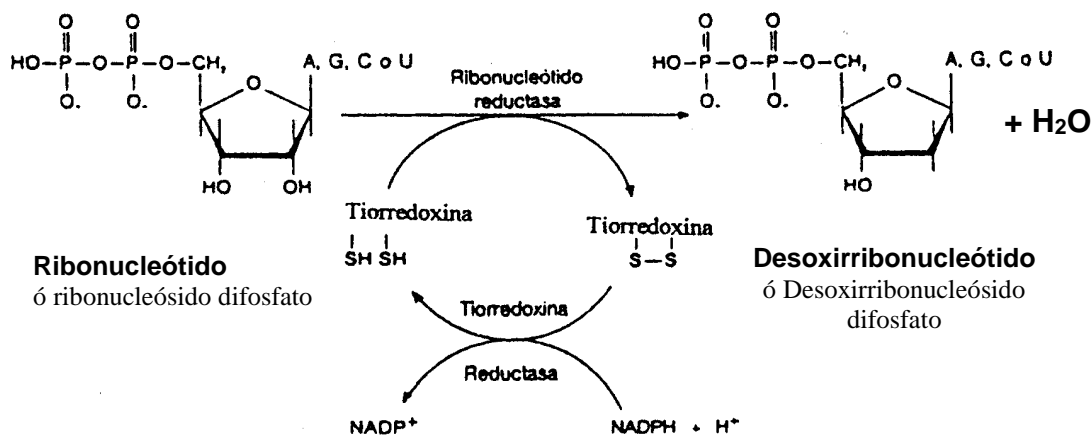
Las células de mamíferos no poseen mecanismos para recuperar bases pirimidínicas libres. Sí vías de recuperación para convertir **nucleósidos** (uridina, citidina y timidina) en sus **nucleótidos**.



BIOSÍNTESIS DE DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS

Normalmente los desoxirribonucleótidos no se sintetizan a partir de la desoxirribosa como elemento de construcción, sino que se forma por reducción directa del carbono 2' de los correspondientes ribonucleótidos. Esta vía ha sido muy estudiada en *E. coli*, donde los 4 ribonucleósidos difosfatos (ADP, GDP, UDP, CDP) son directamente reducidos a los correspondientes desoxi-análogos (dADP, d-GDP, dUDP, dCDP). La reacción es catalizada por la *ribonucleótido reductasa* o *ribonucleósido difosfato reductasa*, enzima que requiere NADPH y tioredoxina.

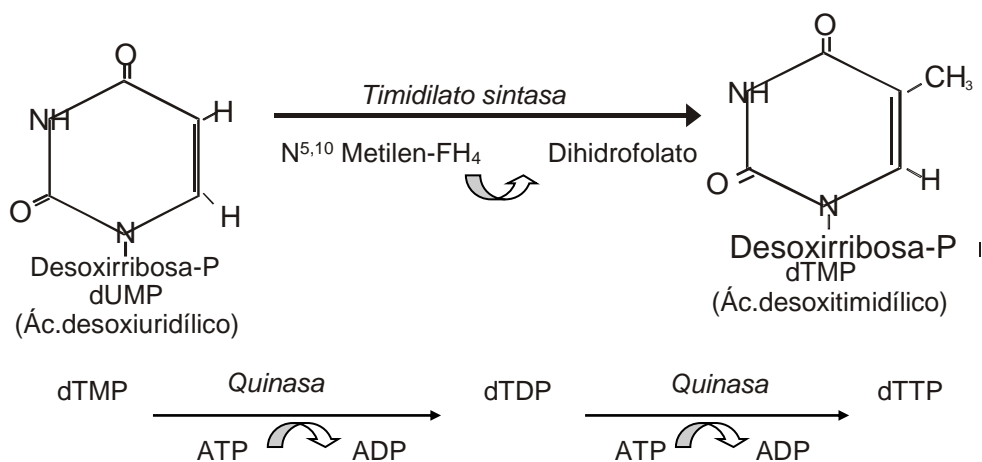
En el siguiente esquema se muestra la reducción en general de los nucleósidos difosfatos en los correspondientes desoxi-nucleósidos difosfatos



El control alostérico se realiza a nivel de la enzima *ribonucleótido reductasa* o *ribonucleósido difosfato reductasa*. El dATP actúa como inhibidor general de la síntesis de todos los ribonucleósidos-5'-difosfatos.

Síntesis de Ácido Desoxitimidílico

El DNA contiene timina en lugar de uracilo, la síntesis de novo solo forma el desoxirribonucleótido de uracilo, la base pirimidina del ARN. La síntesis de timina utiliza como precursor es el dUMP a través de una reacción catalizada por la *Timidilato sintasa*. Una unidad monocarbonada es transferida desde el N5, N10-metileno tetrahidrofolato hasta el dUMP y luego reducida para formar un grupo metilo. La reducción tiene lugar a expensas de la oxidación del tetrahidrofolato a dihidrofolato. La regeneración del tetrahidrofolato se logra por acción de una reductasa con la participación del NADPH



Origen de la coenzima tetrahidrofolato y sus transformaciones a varios derivados transportadores de un carbono

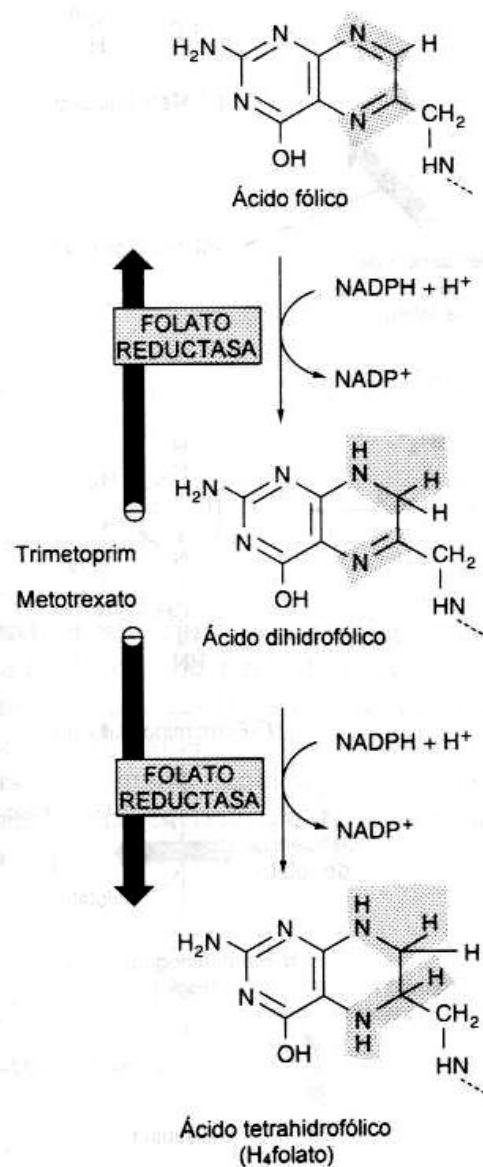
El **ácido fólico**, que se encontró primeramente en las hojas de espinaca, está ampliamente distribuido en las plantas, su deficiencia en mamíferos provoca una disminución de crecimiento y aparición de diversas formas de anemias.

Contiene tres sillares característicos:

- pteridina sustituida
- ácido p-aminobenzoico
- ácido glutámico.

El síntoma bioquímico más sobresaliente de la deficiencia de ácido fólico es el impedimento de la biosíntesis de las purinas y de la timina (pirimidina). La forma de coenzima del ácido fólico actúa en la transferencia de ciertos fragmentos monocarbonados utilizados en ésta y otras rutas biosintéticas. El ácido tetrahidrofólico (FH₄) es el que actúa como transportador intermediario de grupos **hidroximetilos, formilo y metilo**, en gran número de reacciones enzimáticas.

En la figura se observa la reducción del ácido fólico a ácidos dihidrofólico y tetrahidrofólico por la enzima folator reductasa. El trimetoprim es un inhibidor selectivo de la folatorreductasa en bacterias Gram negativas y tiene escaso efecto sobre la enzima de mamíferos. Por tanto se usa como antibiótico. El metotrexato se usa como fármaco anticáncer.



PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1- Indicar la posición principal en el anillo purínico y/o pirimidínico de las células expuestas a los siguientes compuestos:

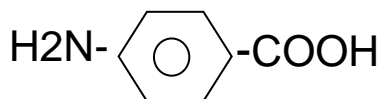
- a) ^{15}N -aspartato b) ^{14}C -serina (grupo hidroximetilo marcado) c) ^3H -oxalacetato

2- El d-UMP se convierte en dTMP mediante la metilación del d-UMP por el N^5N^{10} metilentetrahidrofolato, catalizada por la enzima timidilato sintetasa. El *fluouracilo*, derivado de la uridina, se transforma por la célula en fluodesoxiuridilato (F-dUMP), poderoso inhibidor irreversible de la sintetasa del timidilato (ejemplo de drogas anticancerígenas). ¿Cómo puede interpretarse el hecho de que el fluouracilo inhiba el crecimiento de las células cancerosas que se están dividiendo rápidamente en los animales de experimentación? Dé otros ejemplos de anticancerígenos análogo de timidina.

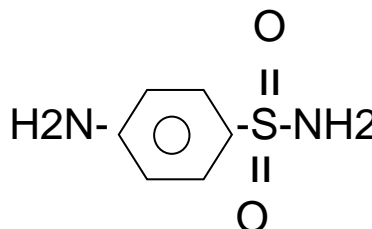
3- Algunas bacterias necesitan la inclusión de ácido p-aminobenzoico en el medio de cultivo para crecer con normalidad. El crecimiento de tales bacterias esta inhibido severamente por la adición de sulfanilamida, una de las primeras drogas con propiedades antibacterianas. Además en presencia de ella se acumula 5'-fosforribosil-4-carboxamida-5-aminoimidazol en el medio de cultivo. Ambos efectos se invierten por adición del exceso de ácido p-aminobenzoico.

- a) ¿Cuál es el papel del Ácido p-aminobenzoico?
 b) ¿Por qué se acumula el compuesto mencionado en presencia de sulfanilamida?
 c) ¿Por qué se invierten la inhibición y la acumulación por la adición de exceso de Ácido p-aminobenzoico?

Ácido p-aminobenzoico



Sulfanilamida



4- El alopurinol, un inhibidor de la xantinoxidasa, se emplea en el tratamiento de la gota crónica. Explique la base bioquímica de este tratamiento. Los pacientes tratados con alopurinol desarrollan, en ocasiones piedras de xantina, aunque la incidencia de lesiones renales es mucho menor que la gota sin

tratar. Explique esta observación a la luz de las solubilidades siguientes en la orina: Ácido úrico: 0,15 g/l; xantina: 0,05 g/l; hipoxantina: 1,4 g/l.

5- Se marcan los siguientes compuestos:

- a) adenosina en el átomo de N del grupo NH_2 .
- b) adenosina en el átomo de C 5.
- c) guanina en el átomo de N del grupo NH_2 .

Mencione donde quedaría la marca en los productos de degradación de purinas en el hombre: ácido úrico y NH_3 .

GUÍA DE ESTUDIO

-¿Qué compuestos ó intermediarios son comunes en la biosíntesis de los nucleótidos púricos y pirimidínicos?

- En la biosíntesis del fosforribosil pirofosfato ¿cuales compuestos se requieren?

Nucleótidos púricos:

Mencione las dos bases púricas que obtiene a partir del IMP.

¿De qué sustancia proviene cada uno de los átomos que conforman el anillo de purina?

¿Cuáles son los compuestos necesarios para su biosíntesis?

¿A nivel de qué enzimas está regulada su biosíntesis?

En la vía de recuperación de bases púricas ¿Qué enzima interviene en cada una de las reacciones?

Nucleótidos pirimidínicos:

¿Cuáles son las bases pirimidínicas que conoce?

¿Qué enzima interviene en su regulación y cual es el compuesto que la inhibe?

¿De qué compuesto proviene cada uno de los átomos que conforman el anillo pirimidínico?

Esquematice la síntesis de desoxi-timidin-monofosfato indicando enzima y cofactores.

Desoxirribonucleótidos:

En la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos ¿Qué átomo de carbono se reduce y cuál es la enzima que cataliza la reacción?

Mencione los desoxirribonucleótidos que conoce.

TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO

CURVA DE CALIBRACIÓN:

Información para el Trabajo Práctico de Laboratorio N°1

OBJETIVO

Que el alumno sea capaz de:

- Comprender el fundamento de la utilización de curvas de calibración para obtener el valor de concentración de una sustancia en solución.
- Conocer cómo se desarrolló la curva de calibración de azúcares reductores que se utilizará en el trabajo práctico de actividad de Invertasa.

INTRODUCCIÓN

Una **curva de calibración** es una curva de referencia construida en un sistema de coordenadas a partir de cantidades o concentraciones conocidas de una sustancia que se toma como patrón, estándar, o testigo (eje x), versus un parámetro medible que varía en forma proporcional a esa concentración, por ejemplo: Absorbancia (eje y).

Dicha curva se utiliza para determinar la cantidad de una sustancia desconocida presente en una muestra por interpolación a partir del parámetro medido en la muestra. Por ejemplo, es posible determinar la concentración de proteínas en solución, a partir de una curva graficada utilizando como patrón, una solución de concentración conocida de albúmina bovina.

En muchas determinaciones se cumple una **relación proporcional** entre la magnitud o intensidad de color del **producto de una reacción** y la **cantidad del sustrato** presente en la muestra, según la ley de Lambert-Beer.

Si se grafica el valor de Absorbancia medido con un espectrofotómetro en función de las concentraciones crecientes de la sustancia patrón se obtiene una recta que permite calcular luego la concentración de dicha sustancia en una muestra determinada.

Los azúcares con propiedades reductoras son aquellos que presentan un grupo cetona o aldehído libre, mediante el cual pueden reaccionar cediendo electrones a otros compuestos. Entre estos azúcares, conocidos en general como “azúcares reductores”, se encuentran glucosa, maltosa, lactosa y galactosa. Si se desea determinar la concentración de azúcar reductor en una muestra desconocida, **previamente** se debe construir una curva de calibración para azúcares reductores utilizando como patrón Glucosa en concentraciones conocidas y crecientes. El método que emplearemos para determinar azúcares reductores se denomina: **Método colorimétrico de Nelson y Somogyi**. En el trabajo práctico (TP) “Estudio cinético de invertasa de levadura” utilizaremos una curva de calibración.

MÉTODO COLORIMÉTRICO DE NELSON y SOMOGYI**Fundamento del método**

Los azúcares reductores cuando son calentados en presencia del reactivo cuprotartárico en medio alcalino moderado, reducen el cobre del estado cúprico a cuproso, formándose Cu_2O . Cuando el Cu_2O es tratado con ácido arsenomolibdico, éste se reduce y forma óxidos de molibdeno de menor valencia, color verde azulado, cuya intensidad de absorción es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes.

Procedimiento general

Sobre una alícuota de solución de glucosa utilizada como patrón (previamente desproteinizadas y filtradas) adicionar el reactivo cuprotartárico, de alcalinidad moderada y mezclar rotando suavemente. Calentar en baño maría hirviente durante 10 min. Enfriar bajo agua corriente sin agitación violenta para evitar la reoxidación del Cu_2O por el oxígeno del aire. En frío agregar el reactivo arsenomolibdico. Leer en espectrofotómetro a 620 nm entre los 15 y 30 minutos después de agregado el reactivo final.

Reactivos (Curva de calibración)

Glucosa	0.003 M
NaOH	0.6 N
SO_4Zn	0.6 N

La solución de glucosa que se utiliza como patrón (en cantidades conocidas y crecientes) para realizar la curva de calibración, es tratada con agentes precipitantes de proteínas (NaOH y SO_4Zn) y luego filtrada. Estos pasos se realizan para igualar las condiciones de reacción con aquellas que se utilizarán en el TP para la determinación de la actividad de invertasa.

Reactivo Cuprotartárico:

Solución A:	Sulfato de cobre al 2 % Sulfato de sodio anhidro al 12 %.
Solución B:	Carbonato de sodio anhidro a 3 % Bicarbonato de sodio al 2% Tartrato de sodio y potasio al 1.5 % Sulfato de sodio anhidro al 12 %

En el momento de usar, mezclar 1 volumen de A y 4 volúmenes de B.

Reactivo Arsenomolibdico:

Solución A:	Molibdato de amonio. 25 g Acido sulfúrico conc. 21 ml
-------------	--

H₂O destilada. 450 ml
 Solución B: Arseniato disódico, 7H₂O. 3 g
 H₂O destilada. 25 ml
 Mezclar y mantener a 37 °C durante 24 hs. Guardar en frasco color caramelo.

TÉCNICA

Preparar la siguiente serie de tubos y agregar los reactivos que se indican a continuación:

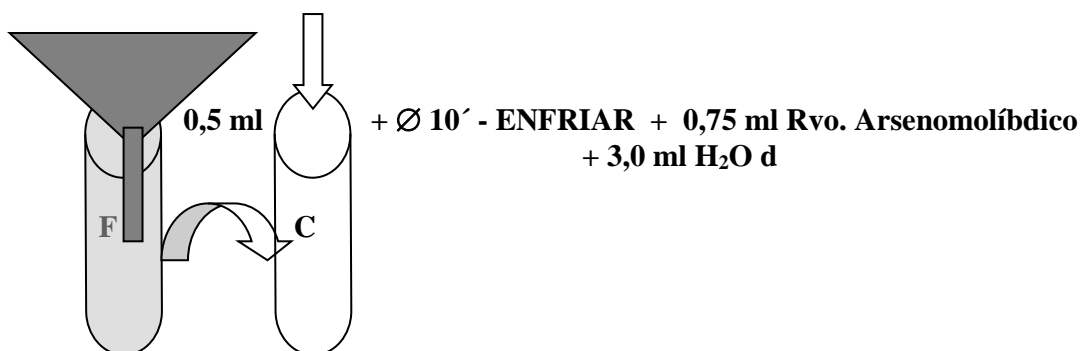
Tubos N°	1 (bco)	2	3	4	5	6
NaOH 0.6 N (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Glucosa 0.003 M (ml)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
SO ₄ Zn 0.6 N (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ O d. (ml)	8.0	7.8	7.6	7.4	7.2	7.0
Mezclar bien y filtrar Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla						
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6
Tomar 0,5 ml de cada filtrado Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color						
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Muestra (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo.Cuprotartárico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Mezclar suavemente Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min. Enfriar con agua corriente y agregar en ml:						
Rvo. Arsenomolibdico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
H ₂ O d.	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Mezclar enérgicamente Leer Absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm . Utilizar como blanco el tubo N° 1 .						

Esquema resumido de la técnica desde la operación de filtrado:

Tomar 0,5 ml de cada filtrado

Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color:

0,75 ml Rvo. Cuprotartárico



RESULTADOS

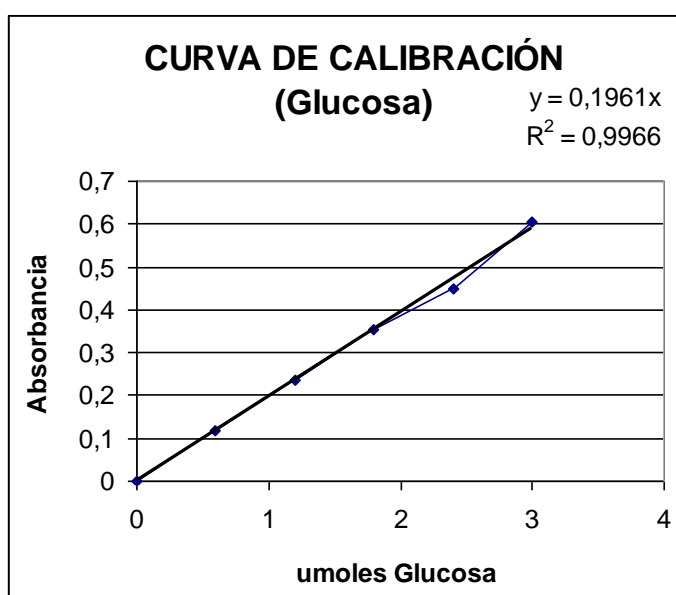
Con los datos obtenidos se grafica **absorbancia** en relación con la **concentración** de glucosa, obteniéndose una recta que pasa por el origen.

Cuando por el efecto de la invertasa sobre sacarosa, se produce una cierta cantidad desconocida de azúcar reductor, ésta puede calcularse por medio de la curva de calibración.

Teniendo en cuenta que las concentraciones finales de glucosa son las siguientes:

Tubo N°	1	2	3	4	5	6
Glucosa (µmoles)	0	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0
ABSORBANCIA	0	0,117	0,236	0,353	0,448	0,606

Graficamos las lecturas de densidades ópticas versus los µmoles de glucosa.



TRABAJO PRÁCTICO N° 1

ESTUDIO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

OBJETIVOS

Que el alumno sea capaz de:

- Determinar la actividad enzimática de la Invertasa.
- Comprender como influyen sobre la actividad enzimática las variaciones de pH y de la temperatura.
- Utilizar la curva de calibración en el cálculo de resultados de velocidad de reacción.
- Realizar e interpretar las gráficas de velocidad inicial en función del pH y en función de la temperatura.

INTRODUCCIÓN

La cantidad de una enzima en una disolución determinada o un extracto de tejido, puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce. Para este objeto es necesario saber:

1. La estequiometría global de la reacción catalizada.
2. Si la enzima precisa de la adición de cofactores, tales como los iones metálicos o coenzimas.
3. Su dependencia de las concentraciones de sustrato o de los cofactores; es decir el valor de K_m para el sustrato y para el cofactor.
4. Su pH óptimo.
5. Una zona de temperatura en que sea estable y muestre actividad elevada.
6. Un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición del sustrato o aparición de los productos.

La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado, o de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores requeridos para la reacción. A fin de que la determinación guarde relación con la cantidad de enzima presente, es necesario medir la velocidad inicial, es decir, aquella obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante en relación con el total presente de la mezcla.

Para indicar la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones. Un modo habitual de indicar la actividad de una enzima es en **Unidades Internacionales**.

Una **Unidad de** cualquier **enzima** es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ($1\mu\text{mol} = 10^{-6} \text{ mol}$) de sustrato por minuto, bajo condiciones definidas de pH y temperatura.

$$\text{Unidad de Enzima} = \frac{\mu\text{mol de Sustrato Transformado}}{\text{min.}}$$

Diversos factores modifican la actividad enzimática, los cuales deben ser tenidos en cuenta para determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Ellos son: **concentración de enzima, concentración de sustrato, temperatura, pH, concentración de cofactores y presencia de inhibidores.**

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *INVERTASA* DE LEVADURA INFLUENCIA DE pH Y TEMPERATURA

La *invertasa* es una enzima que se clasifica en la clase 3 de las hidrolasas y dentro de éstas en la subclase 3.2 de las glicosidasas, siendo específicamente una β -fructofuranosidasa (**EC 3.2.1.26**). El sustrato principal de esta enzima es la sacarosa (disacárido no reductor) y la reacción que cataliza es la siguiente:



La actividad de la enzima en estudio puede determinarse midiendo la concentración de los productos de hidrólisis (azúcares reductores) mediante el método colorimétrico de Nelson-Somogyi.

Obtención de la Enzima

La *invertasa* de la levadura se obtiene por lisis celular y suspensión acuosa, quedando en solución. El extracto centrifugado se utiliza sin más purificación. En un mortero se disgregan juntos 5 g de levadura, 0.5 g de fosfato diamónico y 2 ml de tolueno, se mezclan bien homogeneizando la pasta perfectamente. Se deja 15 minutos a temperatura ambiente y se agregan, en pequeñas porciones, 90 ml de agua destilada a 35 °C, procurando deshacer y suspender bien todo el material con el pilón. Dejar luego en reposo durante 15 min., con agitación ocasional. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 min. Decantar cuidadosamente el sobrenadante que contiene el extracto enzimático.

Detenimiento de la actividad enzimática: Desproteinizado

Para detener la actividad enzimática, una vez cumplido el tiempo de reacción, se separa la enzima por precipitación de todas las proteínas presentes en la muestra, utilizando reactivos de distinta naturaleza.

En este caso la desproteinización se logra con el agregado de NaOH y SO_4Zn , el $\text{Zn}(\text{OH})_2$ formado precipita y arrastra a la enzima. Estas muestras se filtran y sobre una alícuota del filtrado se realiza la reacción de color.

A) INFLUENCIA DE PH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

La actividad de la *invertasa*, como la de todas las enzimas, depende de la composición iónica del medio y muy especialmente del pH. Se estudiará la variación de esa actividad en medios de diferente pH.

Se mantiene constante toda otra variable que afecte la actividad enzimática.

Reactivos:

- Buffer citrato pH = 3.0 - 4.5 y 6.0.
- Citrato trisódico 0.1 M pH = 8.6
- Sacarosa 0.5 M
- NaOH 0.6 N
- SO₄Zn 0.6 N
- Reactivo Cuprotartárico.
- Reactivo Arsenomolibdico.

Extracto enzimático. El extracto es obtenido siguiendo la técnica anteriormente descrita, y **debe diluirse en una relación 1/30.**

TÉCNICA: Ordenar en gradillas diferentes las siguientes series de tubos:

Tubos de reacción	R-1	R-2	R-3	R-4	
Tubos de desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Bco)
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5

Se aconseja trabajar en el orden que se indica a continuación:

a) Colocar en los **tubos de reacción** los siguientes reactivos:

Tubo N°	R-1	R-2	R-3	R4
pH aproximado	3,0	4,5	6,0	8,6
Buffer citrato (ml)	5,0	5,0	5,0	-
Citrato trisódico (ml)	-	-	-	5,0
Sacarosa 0.5 M (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
H ₂ O d. (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
Mezclar y dejar a temperatura ambiente				
Adicionar a c/tubo con pipeta distinta. Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:				
Enzima (1/30) (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Mezclar				
Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido				
Comenzar a contar el tiempo de 10 minutos				
Iniciar el protocolo de desproteinizado, en el tiempo de espera				

b) Colocar en los **tubos de desproteinizado** los siguientes reactivos:

Tubos de desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Bco)
Na(OH) 0.6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Al cabo del tiempo de reacción (10'), extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteinizado D-1, D-2, D-3 y D-4 respectivamente, como se indica a continuación:					
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	No contiene

SO ₄ Zn 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Completar a volumen de 10 ml con H ₂ O d.	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0
Filtrar Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla					
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Tomar 0,5 ml de cada filtrado Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color					
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Filtrado (ml)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Rvo.Cuprotartárico	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
Mezclar suavemente Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min. Enfriar con agua corriente y agregar:					
Rvo. Arsenomolibdico	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
H ₂ O d.	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
Mezclar Leer Absorbancia en fotocolorímetro con filtro 62 o en espectrofotómetro a 620 nm Utilizar como blanco el tubo N° 5.					

RESULTADOS: Con los datos obtenidos completar el siguiente cuadro:

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
pH del medio	3,0	4,5	6,0	7,0
Absorbancia				
µmoles de sacarosa hidrolizada (s h)				
Velocidad inicial (s h ml ⁻¹ min ⁻¹)				

1. **Graficar** sacarosa hidrolizada en función del pH del medio.
2. **Graficar** velocidad inicial de reacción en función del pH.

B) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Reactivos:

- Buffer Citrato pH 4.5
- Sacarosa 0.5 M
- NaOH 0.6 N
- SO₄Zn 0.6 N
- Reactivo Cuprotartárico.
- Reactivo Arsenomolibdico.

Extracto enzimático diluido 1/30.

TÉCNICA: Trabajar de la misma forma como en la parte A

Colocar en los **tubos de reacción** los siguientes reactivos:

Tubo N°	R-1	R-2	R-3	R4
Temp. Incubación (°C)	12	25	45	60
Buffer citrato (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0
Sacarosa 0.5 M (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
H ₂ O d. (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Mezclar y colocar a las temperaturas indicadas unos minutos para termostatizar.</i>				
Adicionar a c/tubo con pipeta distinta. Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:				
Enzima (1/30) (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Mezclar				
Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido				
Comenzar a contar el tiempo de 10 minutos				
Iniciar el protocolo de desproteinizado, en el tiempo de espera				

Colocar en los **tubos de desproteinizado** los siguientes reactivos:

Tubos de desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Bco)
Na(OH) 0.6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Al cabo del tiempo de reacción (10'), extraer 1 ml de la mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteinizado D-1, D-2, D-3, D-4 y D-5 respectivamente, como se indica a continuación:					
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	No contiene
SO ₄ Zn 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Completar a volumen de 10 ml con H ₂ O d.	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0
Filtrar					
Recibiendo en los tubos de filtrado (F) cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla					
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Tomar 0,5 ml de cada filtrado					
Transvasar a los tubos de Colorimetría correspondientes (C), para efectuar la reacción de color					
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Filtrado (ml)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Rvo.Cuprotartárico	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
Mezclar suavemente. Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min.					
Enfriar con agua corriente y agregar en ml:					
Rvo. Arsenomolibdico	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
H ₂ O d.	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
Mezclar					
Leer Absorbancia en fotocolorímetro con filtro 62 o en espectrofotómetro a 620 nm					
Utilizar como Blanco el Tubo N° 5					

RESULTADOS: Con los datos obtenidos completar el siguiente cuadro:

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
Temperatura del medio	12	25	45	60
Absorbancia				
μmoles de sacarosa hidrolizada (s h)				
Velocidad inicial (s h ml ⁻¹ min ⁻¹)				

1. **Graficar** Sacarosa hidrolizada en función de la Temperatura del medio.
2. **Graficar** Velocidad Inicial de reacción en función de la Temperatura.
(sh ml⁻¹ min⁻¹: Sacarosa hidrolizada por mililitro y por minuto)

TRABAJO PRÁCTICO N° 2

TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

OBJETIVOS

- Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- Diferenciar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.
- Demostrar experimentalmente el transporte electrónico mitocondrial en una muestra de tejido animal.
- Comprobar empíricamente la inhibición competitiva de la enzima succinato deshidrogenasa.

INTRODUCCIÓN

En este trabajo de laboratorio se estudiará el funcionamiento de la cadena respiratoria, utilizando succinato como sustrato y azul de metileno como indicador. También en esta experiencia se verificará el efecto inhibitorio del malonato sobre la cadena respiratoria.

Existen algunas sustancias orgánicas no fisiológicas como el azul de metileno, que pueden intercalarse en la secuencia de reacciones de la cadena respiratoria, aceptando los electrones provenientes de la oxidación del sustrato. Estas sustancias son de enorme utilidad para estudiar la organización de la cadena respiratoria.

El azul de metileno es una sustancia auto-oxidante, es decir, puede ser oxidada directamente por el oxígeno molecular adquiriendo un color azul intenso. Al reducirse por captación de hidrógeno, el azul de metileno se decolora.

Aprovechando esta característica del azul de metileno, cuyo potencial de óxido reducción es + 0.01, puede estudiarse la oxidación del ácido succínico a fumárico (potencial redox = - 0.030), reemplazando a la CoQ como aceptora de electrones por el azul de metileno. La velocidad de decoloración del azul de metileno proporciona una indicación de la actividad de la *succínico deshidrogenasa* (que utiliza FAD como grupo prostético) que cataliza la reacción. La acción de inhibidores sobre esta enzima puede estudiarse comparando el tiempo de decoloración del azul de metileno con el tiempo de decoloración normal, en ausencia del inhibidor.

Preparación del extracto enzimático

Se utiliza corazón fresco de vaca, el que se corta en trozos pequeños, se pesan 16 gr y se homogeneizan junto con 40 ml de buffer fosfato pH 7.4 en una licuadora fría. Este preparado se centrifuga durante 10 min a 4000 r.p.m. El sobrenadante contiene entre otras, las enzimas de la cadena de transporte electrónico. El sobrenadante de la centrifugación a bajas revoluciones

se puede centrifugar en ultracentrífuga durante 30 min. a 10.500 r.p.m. El precipitado se retoma con 5 ml de buffer y se homogeneiza. Este homogenato, está enriquecido en mitocondrias, y se puede utilizar como extracto enzimático).

En este trabajo práctico, se demostrará el transporte electrónico mitocondrial a través de la captación de hidrógenos por el azul de metileno y se realizará la inhibición competitiva de la succinato deshidrogenasa por malonato, cuya estructura molecular es muy semejante a la del sustrato de la enzima.

Reactivos:

- Succinato de sodio 0.1 M
- Azul de metileno 0.001 M (diluido 1/20)
- Buffer fosfato pH 7.4
- Malonato de sodio 0.05 M
- Vaselina líquida

Extracto enzimático

Técnica:

Tubo N°	1	2	3	4	5
Succinato de sodio (ml)	0,9	-	0,9	0,9	0,9
Buffer pH 7,4 (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Malonato de Na (ml)	-	-	0,2	-	-
Agua destilada (ml)	2,1	2,0	0,9	1,1	1,1
Azul de metileno (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Succinato deshidrogenasa* (extracto enzimático)	-	1,0	1,0	1,0	1,0

***ANTES DE AGREGAR LA ENZIMA LEER LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES**

Tubo N° 2: agregar la cantidad de enzima que se indica. Mezclar por inversión y colocar suavemente 1,0 ml de vaselina líquida. Tapar enseguida, con un tapón de goma y dejarlo en reposo. Proceder de la misma forma con el resto de los tubos.

Tubo N° 5: agregar la cantidad de enzima que se indica. Mezclar por inversión. **NO se le agrega vaselina ni se lo tapa.** Al decolorarse el tubo N° 5, agítelo y observe.

Después de decolorarse el **tubo N° 4** y habiéndose constatado la inhibición en el **tubo N° 3**, agregar a éste, 0,9 ml. de succinato de sodio para comprobar la inhibición competitiva con **malonato de sodio**.

Resultados

- Registre el tiempo que demora en decolorarse el Azul de metileno en cada tubo.
- Teniendo en cuenta la decoloración ó no del azul de metileno en cada uno de los tubos, fundamente los resultados obtenidos.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3**EVIDENCIA DEL TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOINDUCIDO
EN CLOROPLASTOS****OBJETIVOS**

- Comprender las reacciones redox del transporte de electrones fotosintético utilizando un aceptor artificial de electrones.
- Demostrar experimentalmente el transporte electrónico fotoinducido, en una muestra de tejido vegetal bajo distintas condiciones.
- Comprobar empíricamente la acción de inhibidores del transporte electrónico cloroplástico.
- Comparar la fosforilación oxidativa mitocondrial con la foto-fosforilación cloroplástica.

INTRODUCCIÓN

Los cloroplastos de las plantas superiores catalizan el transporte de electrones dependiente de la luz desde el agua hasta un aceptor, el NADP^+ . Acoplado a este proceso de óxido reducción se produce la fosforilación del ADP. Estos productos, el ATP y el NADPH_2 representan el “poder asimilador” requerido para reducir el CO_2 a hidrato de carbono en la fase oscura.

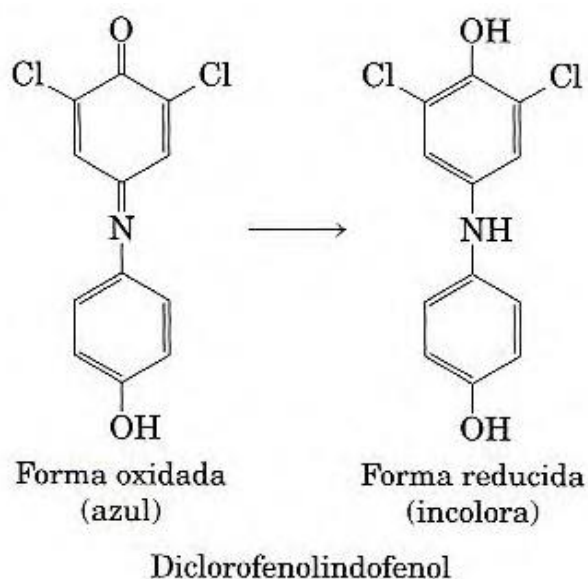
Los componentes de la cadena de transporte electrónico fotosintético están ubicados asimétricamente en la membrana tilacoide del cloroplasto. Cada fotosistema (PS) reduce con luz a su aceptor primario y oxida a su dador primario.

El PS_{II} toma electrones del agua, la que se oxida a O_2 en el proceso llamado “fotólisis del agua”.

El PS_{II} y PS_{I} están conectados en serie por una cadena transportadora de electrones constituida por la plastoquinona, el complejo de citocromo b6-f y plastocianina.

El PSI cede sus electrones a la ferredoxina, la que se oxida por la ferredoxina NADP^+ oxidoreductasa al reducir al NADP^+ . Esta enzima terminal del transporte de electrones fotosintético puede reducir además del NADP^+ distintos aceptores artificiales de electrones como el metilviológeno, ferricianuro de potasio y el 2,6-dicloro fenol indofenol (DCPIP). Este último compuesto presenta la ventaja de ser azul cuando está oxidado e incoloro cuando se reduce.

Los objetivos de este trabajo son evidenciar el transporte de electrones cloroplástico bajo distintas condiciones de incubación de un extracto crudo de hojas y comprender las reacciones redox del transporte de electrones fotosintéticos utilizando al DCPIP como aceptor artificial de electrones. Se utilizarán CuCl_2 y el herbicida 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU o Diurón) como inhibidores del transporte electrónico cloroplástico.

**Reactivos:**

- Buffer de ruptura: Fosfato 100mM, Sacarosa 250 mM, MgCl_2 5mM, NaCl 50 mM, pH 7,8.
- 2,6-dicloro fenol indofenol (DCPIP) 0.5mM
- CuCl_2 30 mM
- 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU o Diurón) 6mM

TÉCNICA**A) Obtención de cloroplastos:**

- 1) Lavar y enjuagar con agua destilada 20 g de hojas de espinaca (*Spinacea oleracea*) descartando las grandes nervaduras y cortándolas en trozos medianos.
- 2) Homogeneizar en licuadora fría con 100 ml de buffer de ruptura helado, mediante 4 pulsos de 5 segundos cada uno.
- 3) Filtrar rápidamente el homogenato por gasa, sobre baño de hielo. Distribuir en tubos de centrifuga enfriados.
- 4) Centrifugar el filtrado a 7000 x g durante 5 minutos. (Calcular las rpm equivalentes en función de la ultracentrífuga refrigerada a utilizar).
- 5) Descartar el sobrenadante y resuspender el **precipitado de cloroplastos de todos los tubos de centrifuga** con un total de 5 ml de buffer de ruptura.

B) Demostración del transporte electrónico cloroplástico bajo distintas condiciones:

Reactivos /Tubo (ml)	1	2	3	4	5	6	7
Buffer ruptura	2,5	2,3	2,3	2,2	2,1	2,3	2,8
CuCl ₂	---	---	---	---	0,2	---	---
DCMU (Herbicida)	---	---	---	0,1	---	---	---
DCPIP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	---
Cloroplastos	---	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 (*)	0,2
Luz	+	(**)	+	+	+	+	+
Iluminar simultáneamente todos los tubos							
Tiempo de decoloración							
Justificación de resultados							

(*) Previamente calentar a baño maría 5 min

() Cubrir el TUBO 2 con papel de aluminio**

- ¿Qué ocurre si se retira el papel de aluminio al TUBO 2 después de 15 min?
- Sacar conclusiones.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO: Vía Glicolítica

Demostración de la fermentación en levaduras

OBJETIVOS

Que el alumno pueda:

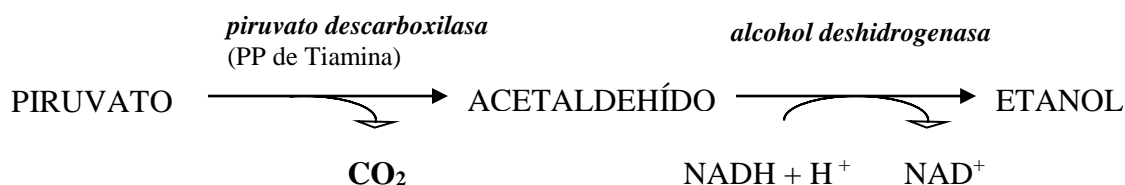
- Adquirir destreza en el manejo de pipetas automáticas.
- Comprobar experimentalmente el mecanismo de adaptación del metabolismo de glucosa a las condiciones ambientales.

INTRODUCCIÓN

Las células animales, los microorganismos y las plantas utilizan como principal fuente de energía los hidratos de carbono. A partir de su degradación obtienen energía en forma de ATP y otros compuestos de alto contenido energético los cuales son utilizados en los procesos de biosíntesis.

Los intermediarios metabólicos obtenidos de la degradación de la glucosa dependen de las condiciones ambientales en que se encuentran las células, si la concentración de oxígeno es suficiente generalmente se degradan totalmente hasta CO_2 y H_2O . Por el contrario, cuando la concentración de oxígeno es escasa, la célula recurre a la fermentación. A través de este proceso se obtienen diferentes tipos de intermediarios metabólicos según el tipo de célula y de los sustratos disponibles: Por ejemplo una célula muscular y ciertos tipos de lactobacilos acumulan ácido láctico, ciertas levadura producen alcohol, etc.

En la industria se aprovecha la capacidad de muchos microorganismos de acumular metabolitos que son de gran utilidad. Por ejemplo en la fabricación de pan y de vino se utilizan cepas diferentes de la levadura *Saccharomyces cereviceae*.



EFECTO PASTEUR

Cultivando levaduras, Louis Pasteur observó que el consumo de glucosa en un medio anaeróbico era considerablemente mayor que el observado en cultivos con abundante provisión de oxígeno. Esto se llamó “Efecto Pasteur”, el cual es un mecanismo de adaptación de las células, donde la velocidad de utilización de glucosa es ajustada a los requerimientos metabólicos de la misma.

El fundamento bioquímico del “Efecto Pasteur” es el siguiente:

El rendimiento de ATP de la glucólisis en condiciones anaeróbicas es de 2 ATP, por molécula de glucosa, que es mucho menor que el de la oxidación completa de glucosa a CO_2 en condiciones

aeróbicas que corresponden a 36 o 38 ATP por molécula de glucosa. Para conseguir la misma cantidad de ATP se ha de consumir 18 veces más glucosa en condiciones anaeróbicas.

En el Trabajo práctico se estudiará el “Efecto Pasteur” comparando el consumo de glucosa entre un cultivo de levaduras “*Saccharomyces cereviceae*” mantenidos en condiciones aeróbicas y otro en condiciones anaeróbicas.

PARTE EXPERIMENTAL

Medio de cultivo: Extracto de Levadura 0,01 gr; glucosa 1,00 gr.; (NH₄)₂ SO₄ 0,1 gr.; KH₂PO₄ 0,04 gr.; MgCl₂ 0,04 grs.; FeSO₄ 0,01 gr.; H₂O dest. c.s.p. 200 ml.; pH: 4,5-5,00.

Inocular con 10 ml de una suspensión de levaduras (1g en 10 ml de H₂O) en Erlenmeyers de 250 ml y 125 ml conteniendo 100 ml del medio de cultivo cada uno. Incubar durante 24 hs, el Erlenmeyer de 250 ml en condiciones **aeróbicas** en un shaker a 100 rpm, al Erlenmeyer de 150 ml agregar una capa de vaselina para crear condiciones de **anaerobiosis** y mantener en reposo.

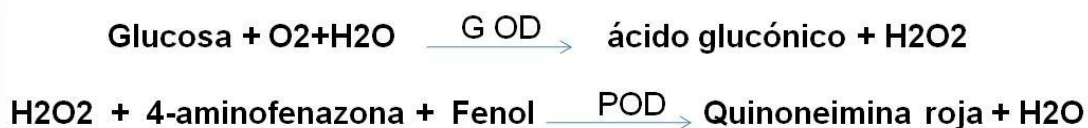
DETERMINACIONES A REALIZAR

Para proceder a la determinación de los metabolitos correspondientes se tomará una alícuota de 5 ml. de cultivo, si es necesario se hace una centrifugación previa para evitar interferencias por sustancias en suspensión.

a) DETERMINACIÓN DE GLUCOSA:

Se determinará cuantitativamente al comenzar y al finalizar la experiencia con el objeto de ver el consumo de la glucosa por la célula microbiana.

Fundamento del método: La *glucosa es oxidada* enzimáticamente por la glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y H₂ O₂ en presencia de una *peroxidasa* (POD) produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona dando lugar a la formación de un cromógeno rojo con absorbancia a 505 nm de acuerdo a la siguiente reacción:



La quinonimina es un compuesto de color rojo que tiene un pico de absorción a 505 nm.

La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa.

Reactivos

Standard: solución de glucosa 1g/l

GOD/POD: solución de glucosa oxidasa (1000U/l) y peroxidasa (120 U/l)

4-AF: solución de 4-aminofenazona (25 mmol/l) en buffer tris.

Fenol: solución de fenol (55 mmol/l)

TÉCNICA

Preparar 5 tubos de hemólisis rotulados de la siguiente forma:

Tubo 1- Medio inicial; Tubo 2- Anaeróbico; Tubo 3- Aeróbico; Blanco y Testigo.

TUBOS	BLANCO	TESTIGO	1 inicial	2 anaeróbico	3 aeróbico
Muestra (μl)	----	--	10 (*)	10	10
Testigo (μl)	----	10	---	---	---
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1	1	1

Mezclar e incubar 10 min a 37 °C. Leer a 505nm.

(*) En el medio inicial, la concentración de glucosa es superior al rango lineal de la reacción de color, por ello es que se realiza una dilución de la muestra a la mitad y se toman los 10μl de esta dilución. En el cálculo final multiplicar por dos el resultado obtenido para este tubo.

Cálculos:

Determinar la concentración de glucosa de cada tubo muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

Glucosa g/l: Absorbancia de la muestra corregida x f

$$f = \frac{1,00\text{g/l}}{\text{Abs. Testigo corregida}}$$

b) DETERMINACIÓN DE ALCOHOL: MÉTODO DE MICRODIFUSIÓN

Fundamento: El etanol reacciona con una solución de dicromato de potasio en medio sulfúrico causando la oxidación del alcohol a ácido acético y la reducción del ión dicromato (color naranja) a crómico (color azul).

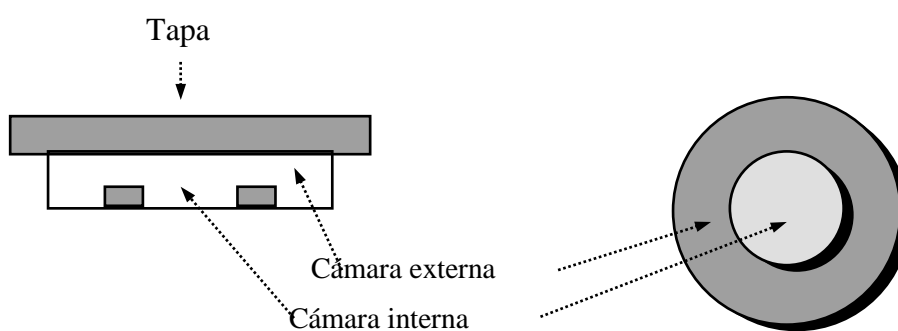


Etanol dicromato de K
(naranja)

Ac. acético

sulfato crómico
(verdoso)

La determinación por microdifusión se realiza en celda de Conway, que consta de una cámara central y una externa, ambas recubiertas por una tapa común.



Representación esquemática de la celda de Conway

Reactivos:

- Solución saturada de carbonato de potasio: Agregar K_2CO_3 a 9 ml de H_2O hasta saturación.
- Dicromato de potasio en medio sulfúrico: $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$, 0.9 g; H_2O d., 34,50 ml;
 SO_4H_2 64,6 ml. llevar a 150 ml con H_2O d.
- Testigo de etanol absoluto (4 g/l): 0,05 ml de etanol en 10 ml de SF (0,9 % de ClNa)

TÉCNICA:

Seguir el protocolo, utilizando 3 celdas de Conway diferentes:

C1 : Cultivo Aeróbico

C2: Cultivo Anaeróbico

C3: Testigo

Cámara	Reactivos (ml)	Celda 1	Celda 2	Celda testigo
central	Solución sulfúrica $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ (ml)	0.7	0.7	0.7
externa	Solución saturada CO_3K_2 (ml)	0.5	0.5	0.5
	Muestra (ml) (sobrenadante de cultivo)	2.0 (Aeróbico)	2.0 (Anaeróbico)	-
	Solución Testigo, etanol absoluto (ml)	-	-	2.0

-Tapar perfectamente cada una de las celdas e incubar en estufa a 37°C durante 15 min aprox.

Observar el cambio de color y justificar los resultados.

	Medio de cultivo inicial	Sobrenadante de cultivo en aerobiosis	Sobrenadante de cultivo en anaerobiosis
Concentración de Glucosa remanente			
Presencia de Etanol			

TRABAJO PRÁCTICO N° 5**CICLO DE KREBS****DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO****OBJETIVOS**

- Analizar el metabolismo de hidratos de carbono y ciclo de Krebs mediante la determinación del ácido cítrico generado por un cultivo de *Aspergillus Níger*.
- Demostrar la utilización de ácido cítrico en la industria alimentaria, determinando su presencia en distintos alimentos manufacturados.

INTRODUCCIÓN

El citrato es una sustancia natural presente en plantas. Industrialmente es obtenido principalmente a través de procesos que precisan de la intervención de microorganismos productores de ácidos orgánicos dentro de los que se destacan los hongos filamentosos, especialmente de los géneros *Aspergillus Níger* y *Penicillium*.

Alrededor del 60 % del ácido cítrico producido es utilizado en la industria alimenticia, un 10 % en la industria farmacéutica y un 25 % en la industria química. En la industria alimentaria se adiciona como conservantes y para realzar el sabor. En la industria química como agente anti-espuma, como suavizante y para el tratamiento de textiles, además por ser fácilmente biodegradable también es utilizado en detergentes para reemplazar a los polifosfatos cuyo uso ha sido prohibido en muchos lugares.

Procedimiento general

Para determinar la producción de ácido cítrico en cultivo se utilizará la cepa mutante de *Aspergillus niger* NRRL -1419. Esta cepa es seleccionada específicamente por poseer la característica de producir la acumulación de grandes cantidades de ácido cítrico, cuando es cultivada en un medio con alto contenido de sacarosa.

Para la determinación de ácido cítrico en alimentos se utilizarán muestras de caldo concentrado, jugo de manzana y vino blanco de mesa, de marcas comerciales.

La determinación de ácido cítrico se realizará mediante el método espectrofotométrico de la piridina-anhídrido acético.

Inoculación de un medio de cultivo específico con *Aspergillus niger* NRRL

- En un erlenmeyer de 250ml, conteniendo 100 ml de un medio específico estéril.

El medio contiene sacarosa como fuente de carbonos, extracto de levadura que aporta nitrógeno (desde aminoácidos), micronutrientes (vitaminas) y determinados minerales como Mg^{+2} , K^{+} y Cu^{+2} .

- Se siembran 10 ml de un inóculo de *A. niger* y se coloca en condiciones aeróbicas, a 100 rpm, a 28° C durante 5 días.

Determinación de Ácido Cítrico en alimentos:

Se determina Ácido cítrico en muestras de los siguientes alimentos procesados por la industria alimentaria. Las muestras utilizadas son:

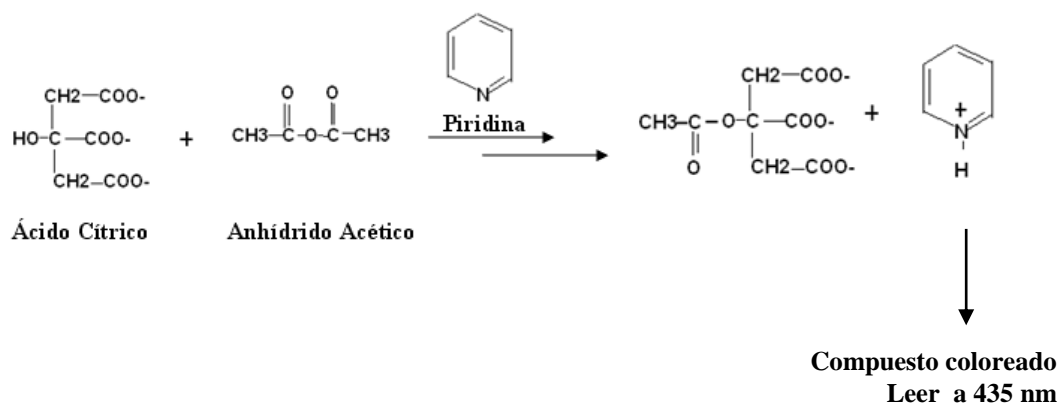
- Caldo concentrado para sopas (marca comercial) en el que Ácido cítrico es agregado como **secuestrante o quelante**. Como tal tiene la función de estabilizar el alimento, al reaccionar con los iones metálicos y alcalinotérreos para formar complejos que alteran las propiedades de los iones y sus efectos sobre el alimento. Los agentes secuestrantes empleados en la industria alimentaria son sustancias naturales, como los ácidos policarboxílicos (tartárico, oxálico, succínico) siendo el Ácido cítrico y sus derivados el más utilizado.
- Jugo de manzana (marca comercial). En estas bebidas el Ácido cítrico se utiliza como **acidulante y realzante** del sabor.
- Vino blanco de mesa. En esta muestra no se emplea como agregado especial en la industria vitivinícola, es posible encontrarlo en los vinos como un *producto paralelo* a la fermentación alcohólica y en muy baja concentración.

Diluciones de las muestras de alimentos a utilizar:

Caldo para sopa	Dilución 1:2 con agua dest.
Jugo de manzana	Dilución 1:5 con agua dest.
Vino blanco	Sin diluir

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA PIRIDINA-ANHÍDRIDO ACÉTICO

Este método se basa en la formación de un producto de color amarillo ocre, formado por la reacción entre el ácido cítrico y el anhídrido acético en presencia de piridina. El anhídrido acético actúa acilando al grupo hidroxilo unido al carbono 3 (C3) del ácido cítrico. Piridina actúa como una base, favoreciendo la reacción.



Reactivos

- Piridina
- -Anhídrido acético (**PRECAUCIÓN:** reactivo volátil)
- -Testigo de ácido cítrico 0,3 g/l.

PRECAUCIONES

- Trabajar con los reactivos **bajo campana** y con **propipeta**. Observar que el nivel del líquido **nunca** llegue a la propipeta.
- Mantener los tubos de reacción tapados en todo momento.
- En la mesada también trabajar con propipeta, particularmente con el medio de cultivo.
- Mantener ventilado el ambiente.
- Trabajar con guantes, antiparras y barbijo
- El material debe ser lavado por los encargados de la comisión para evitar inconvenientes, debe dejarse correr abundante agua.
- Hacer las lecturas con la cubeta cargada bajo campana y tapadas.

TÉCNICA:

Preparar una serie de 4 tubos de hemólisis: Blanco, Testigo y Muestras (M1, M2, etc).

Trabajar bajo campana y tapar los tubos una vez cargados siguiendo el siguiente protocolo:

	Blanco	Testigo	M1	M2
Muestra de sobrenadante de cultivo (M1)	----	----	0,15 ml	----
Muestra de producto alimenticio (M2)	----	----	----	0,15 ml
Testigo	----	0,15 ml	----	----
Piridina	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Colocar en baño maría de 37° C				

Anhídrido acético (agregar gota a gota, agitando)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Incubar 30 min a 37° C. Leer a 435 nm llevando a cero con el blanco. Estabilidad del color 10-15 min. Utilizar celda de vidrio o cuarzo para la lectura.				

Cálculos

$$\text{Ac. Cítrico (g/l)} = M \times F$$

$$\text{Factor} = \frac{0,3 \text{ g/l}}{T}$$

M = Absorbancia de la muestra corregida

T = Absorbancia del testigo corregida

En **muestras diluidas**, multiplicar el resultado por el factor de dilución.

BIBLIOGRAFÍA

- Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. Capítulo 2.
- BLANCO, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8° edición, Bs.As, 2006. Reimpresión año 2007.
- CHAMPE, HARVEY, FERRIER, "Bioquímica", Editorial Mac Graw- Hill Interamericana, 3° Edición. 2006
- FEDUCHI, E, BLASCO I, ROMERO, C , YAÑEZ, E. "Bioquímica. Conceptos esenciales". Editorial Panamericana. 1° Edición, 2010. Reimpresión año 2011.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Editorial Omega, S.A., 6° Edición..
- Libro presentado por el Curso Química Biológica en la Editorial de la UNSL, para su publicación, titulado "QUÍMICA BIOLÓGICA"
- MURRAY, MAYE, GRANNER, MAYES, RODWELL. "Bioquímica de Harper". 28° Edición
- SOMOGYI M., 1952, Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method. J.Biol.Chem., 200:245.